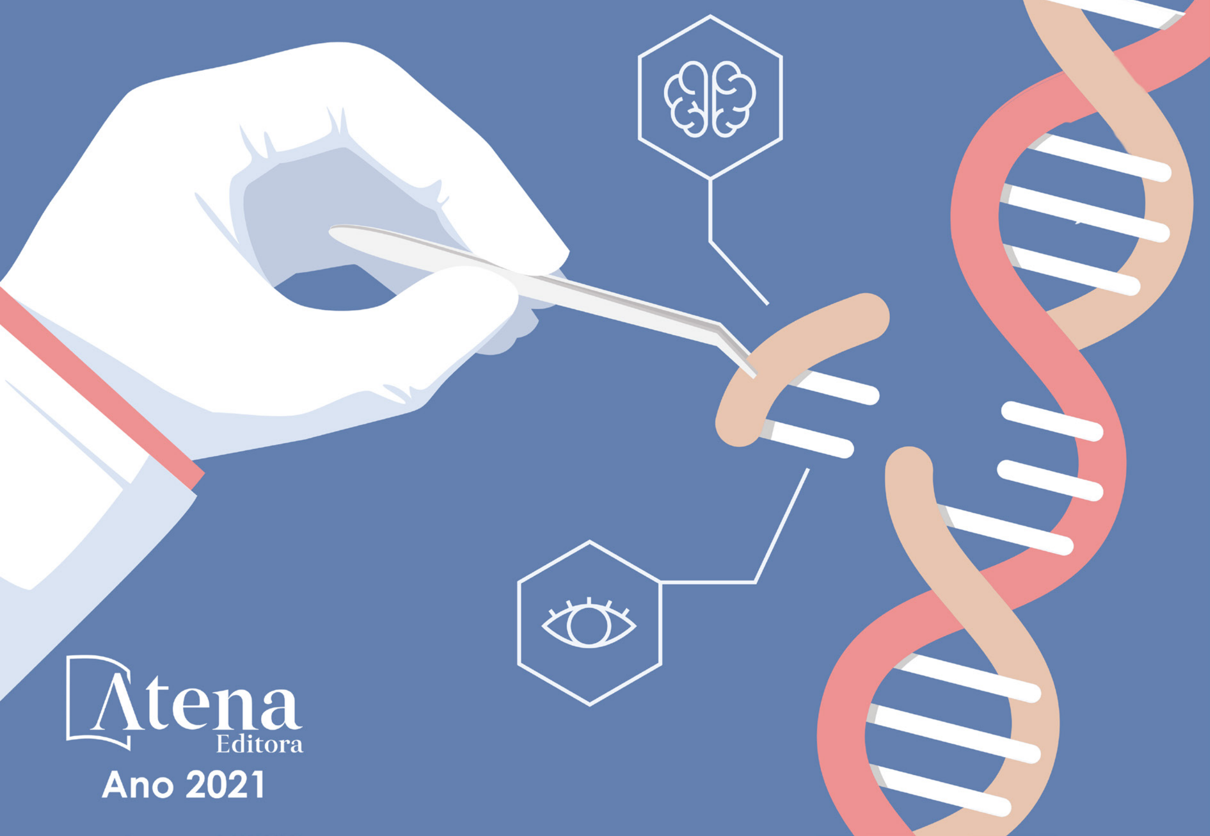
A GENÉTICA E A CONSTRUÇÃO DE NOVOS PARADIGMAS NAS CIÊNCIAS DA VIDA

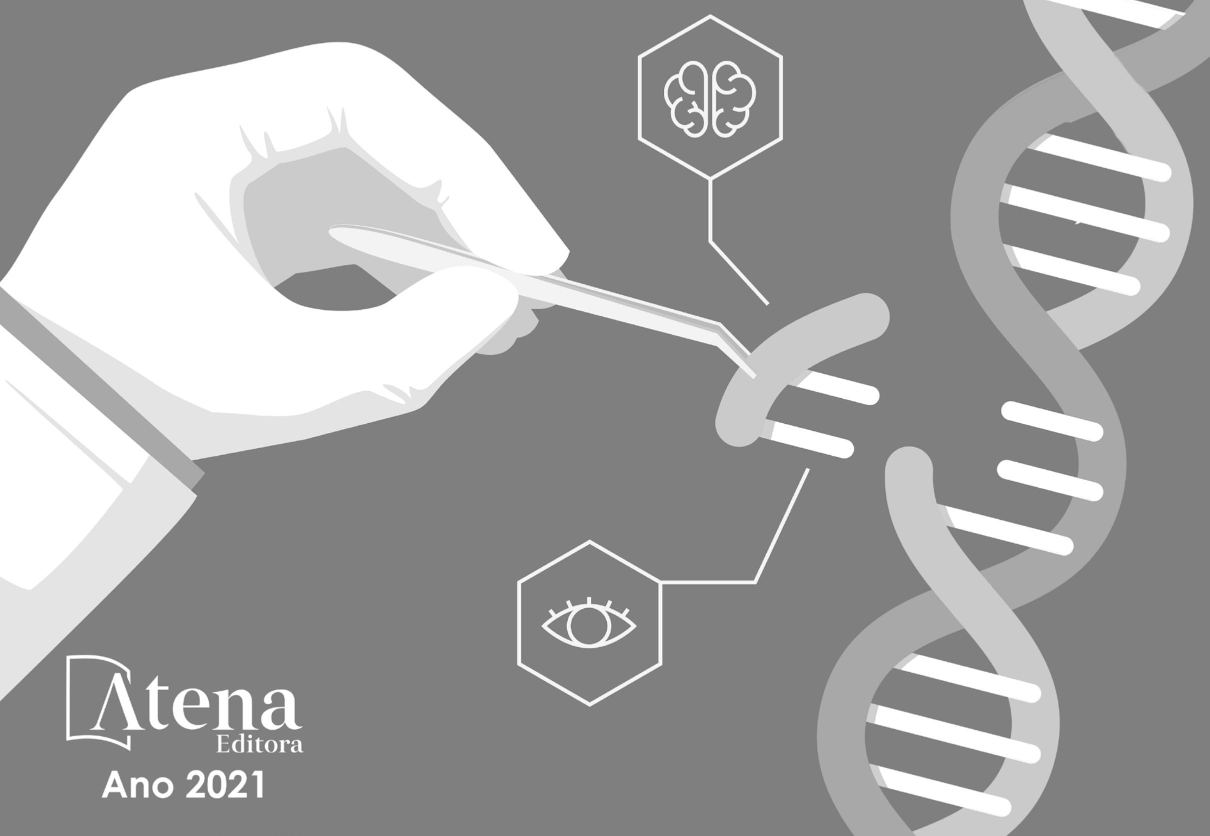
Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)



Atena
Editora
Ano 2021

A GENÉTICA E A CONSTRUÇÃO DE NOVOS PARADIGMAS NAS CIÊNCIAS DA VIDA

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)



Atena Editora
Ano 2021

Editora Chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Assistentes Editoriais
Natalia Oliveira
Bruno Oliveira
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto Gráfico e Diagramação
Natália Sandrini de Azevedo
Camila Alves de Cremo
Luiza Alves Batista
Maria Alice Pinheiro
Imagens da Capa
Shutterstock
Edição de Arte
Luiza Alves Batista
Revisão
Os Autores

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Atena Editora
Ano 2021

Ciências Biológicas e da Saúde

Atena Editora
Ano 2021

Ciências Biológicas e da Saúde

A genética e a construção de novos paradigmas nas ciências da vida

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Maria Alice Pinheiro
Correção: Flávia Roberta Barão
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizador: Benedito Rodrigues da Silva Neto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G328 A genética e a construção de novos paradigmas nas ciências da vida / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5706-916-5
DOI 10.22533/at.ed.165211903

1. Genética. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da (Organizador). II. Título.

CDD 576.5

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2021

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

Ciências Biológicas e da Saúde

Atena Editora
Ano 2021

APRESENTAÇÃO

Apresentamos o livro "A Genética e a construção de novos paradigmas nas Ciências da Vida", um material rico e direcionado *à* todos acadêmicos e docentes com interesse pela genética.

A genética e suas aplicações tem influenciado diversas pesquisas promissoras em todo o mundo, contribuindo de forma significativa na saúde, agricultura, economia e biotecnologia. Aliada à revolução tecnológica essa subárea tem contribuído muito nos últimos anos com o avanço no campo da pesquisa. Como sabemos a genética possui um campo vasto de aplicabilidades que podem colaborar e cooperar grandemente com os avanços científicos e entender um pouco mais da pesquisa e recursos genéticos é o enfoque desta obra.

Deste modo, abordamos nesta obra assuntos relativos aos avanços e dados científicos aplicados aos recursos genéticos, o leitor poderá se aprofundar em temas direcionados à mitose, saúde e ambiente, célula e saúde, Cromossomo Philadelphia, biometria, DRESS, reações a drogas, exantema, ensino, laboratórios, extração DNA, tecidos vegetais, pureza e integridade, Stylosanthes sp., *Hylocereus*, conservação, variabilidade, RNA, método de extração, *Stylosanthes,* telômeros, telomerase, micropropagação, TCL, *Crambe abyssinica* Hochst, germinação, produção, herdabilidade, divergência genética, câncer, *Danio Rerio*, *Eye Disorders*, *Kidney Disease*, *Neurological Disorders*, *In Vivo Animal model*, dentre outros.

Esperamos que mais uma vez o conteúdo deste material possa somar de maneira significativa aos novos conceitos aplicados à genética, influenciando e estimulando cada vez mais a pesquisa nesta área em nosso país. Parabenizamos cada autor pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, e principalmente à Atena Editora por permitir que o conhecimento seja difundido e disponibilizado para que as novas gerações se interessem cada vez mais pelo ensino e pesquisa em genética.

Desejo a todos uma excelente leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1

ALTERAÇÕES GENOTÓXICAS, CITOTÓXICAS E MUTAGÊNICAS: UM CONTEÚDO A SER ILUSTRADO E TRABALHADO NO ENSINO MÉDIO

Rosanne Lopes de Brito
Cristiano Aparecido Chagas
Júlio Brando Messias
Erika Maria Silva Freitas
Luiz Augustinho Menezes da Silva
Gerusa Tomaz de Aquino Beltrão
Mônica Simões Florêncio
Igor Cassimiro dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.1652119031

CAPÍTULO 2 14

CARACTERIZAÇÃO DO CROMOSSOMO PHILADEPHIA EM TUMORES NÃO-SÓLIDOS: UMA ABORDAGEM CITOGENÉTICA AO CÂNCER

Caio Bezerra Machado
Beatriz Maria Dias Nogueira
Adrhyann Jullyanne de Sousa Portilho
Manoel Odorico de Moraes Filho
Maria Elisabete Amaral de Moraes
Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes

DOI 10.22533/at.ed.1652119032

CAPÍTULO 3 22

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE FRUTOS DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*)

Ana Valéria Costa da Cruz
Beatriz da Silva Rodrigues
Amando Oliveira Matias
Michelli Ferreira dos Santos
Clarissa Gomes Reis Lopes
Angela Celis de Almeida Lopes
Sérgio Emílio dos Santos Valente
Marcones Ferreira Costa

DOI 10.22533/at.ed.1652119033

CAPÍTULO 4 33

DRESS: SÍNDROME DA HIPERSENSIBILIDADE A DROGAS COM EOSINOFILIA E SINTOMAS SISTÊMICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Italo Felipe Cury
Eduarda Pereira Ceroni
Julia Libanori Fragoso
Leticia Nunes Montes
Louise Volpini Lustosa
Maria Clara Amaral de Arruda Falcão Ferro
Samara Tatielle Monteiro Gomes

DOI 10.22533/at.ed.1652119034

CAPÍTULO 5 37

ELABORAÇÃO DE MANUAL PRÁTICO COMO INSTRUMENTO PARA ENSINO EM LABORATÓRIOS ACADÊMICOS DE RADIOLOGIA ODONTOLÓGICA

Johnatan Luís Tavares Góes

Pedro Luiz de Carvalho

DOI 10.22533/at.ed.1652119035

CAPÍTULO 6 44

EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES TECIDOS DA ESPÉCIE LEGUMINOSA FORRAGEIRA *Stylosanthes capitata VOGEL*

Fernando Bonifácio-Anacleto

Carolina Costa Silva

Priscila Marlys Sá Rivas

Carlos Alberto Martinez

Ana Lilia Alzate-Marin

DOI 10.22533/at.ed.1652119036

CAPÍTULO 7 55

INTRODUÇÃO DE BANCO DE GERMOPLASMA DE PITAYA NO IFES CAMPUS ITAPINA

Luis Carlos Loose Coelho

Pamela Vieira Coelho

Roberto Kirmse

João Pedro Silva de Abreu

Jhonathan Elias

Hércules dos Santos Pereira

Carolina Maria Palácios de Souza

Jadier de Oliveira Cunha Junior

Ana Paula Cândido Gabriel Berilli

Ronilda Lana Aguiar

DOI 10.22533/at.ed.1652119037

CAPÍTULO 8 60

MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE ALTA PUREZA A PARTIR DE FOLHAS DA ESPÉCIE *Stylosanthes capitata* (VOGEL)

Fernando Bonifácio-Anacleto

Priscila Marlys Sá Rivas

Tathyana Rachel Palo Mello

Carlos Alberto Martinez

Ana Lilia Alzate-Marin

DOI 10.22533/at.ed.1652119038

CAPÍTULO 9 72

O PAPEL DOS TELÔMEROS NA PROTEÇÃO DO DNA E VIABILIDADE CELULAR

Beatriz Maria Dias Nogueira

Caio Bezerra Machado

Adrhyann Jullyanne de Sousa Portilho

Raquel Carvalho Montenegro

Manoel Odorico de Moraes Filho
Maria Elisabete Amaral de Moraes
Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes
DOI 10.22533/at.ed.1652119039

CAPÍTULO 10..82

ORGANOGÊNESE DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* Sims) POR MEIO DA TÉCNICA TCL (*THIN CELL LAYER*)
Elias da Cruz Ribeiro
Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso
Jonny Everson Scherwinski-Pereira
DOI 10.22533/at.ed.16521190310

CAPÍTULO 11..90

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO DO CRAMBE SOB DIFERENTES DOSES DE ADUBAÇÃO NITROGENADA
Víctor dos Santos Rosa de Oliveira
Rafael Hydalgo Passeri-Lima
Juliana Correa Araújo
João Pedro Vanderlei Machado
Bruna Rafaela da Silva Menezes
DOI 10.22533/at.ed.16521190311

CAPÍTULO 12..101

SIMILARIDADES E DISSIMILARIDADES EM EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE JAMBU [*Acmella oleracea* (L.) R.K. JANSEN]
Joyce da Costa Dias
Mônica Trindade Abreu de Gusmão
Camila Monteiro Salgado
Leonel Rodrigues Souza
DOI 10.22533/at.ed.16521190312

CAPÍTULO 13..114

ZEBRAFISH MODEL IN THE STUDY OF HUMAN DISEASE
Inês Dias
Paulo Teixeira
Fernando Mendes
Diana Martins
DOI 10.22533/at.ed.16521190313

CAPÍTULO 14..134

ASSOCIAÇÃO RARA DAS SÍNDROMES XYY E DELEÇÃO DO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 18 EM UM RECÉM-NASCIDO: RELATO DE CASO
Marta Marques de Carvalho Lopes
Rejane Alves de Carvalho Monteiro
Isabela Aurora Rodrigues
Juliana Gonçalves de Araújo Fernandes
Isabelly Rocha Borges

Luana Marcelina Silva Pereira
Edynara Rocha Araújo
Uyara da Silva Cadar
Ruth Cop Ferreira
DOI 10.22533/at.ed.16521190314

CAPÍTULO 15..........143

SÍNDROME DE DELEÇÃO 18p COMO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA BAIXA ESTATURA: RELATO DE CASO
Rejane Alves de Carvalho Monteiro
Marta Marques de Carvalho Lopes
Isabela Aurora Rodrigues
Juliana Gonçalves de Araújo Fernandes
Isabelly Rocha Borges
Luana Marcelina Silva Pereira
Uyara da Silva Cadar
Raquel Tavares Boy da Silva
DOI 10.22533/at.ed.16521190315

SOBRE O ORGANIZADOR..........154

ÍNDICE REMISSIVO..........155

CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES GENOTÓXICAS, CITOTÓXICAS E MUTAGÊNICAS: UM CONTEÚDO A SER ILUSTRADO E TRABALHADO NO ENSINO MÉDIO

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 29/01/2021

Rosanne Lopes de Brito
EREM Des. Antônio da Silva Guimarães,
Secretaria de Educação Pernambuco
Cabo de Santo Agostinho – Pernambuco
http://lattes.cnpq.br/9381916668814475

Cristiano Aparecido Chagas
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
Vitória de Santo Antão – Pernambuco
http://lattes.cnpq.br/3655967111364115

Júlio Brando Messias
UPE – Universidade de Pernambuco
Recife – Pernambuco
http://lattes.cnpq.br/8026582094695637

Erika Maria Silva Freitas
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
Vitória de Santo Antão – Pernambuco
http://lattes.cnpq.br/6558845922911768

Luiz Augustinho Menezes da Silva
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
Vitória de Santo Antão – Pernambuco
http://lattes.cnpq.br/9464662192559604

Gerusa Tomaz de Aquino Beltrão
UPE – Universidade de Pernambuco
Recife – Pernambuco
http://lattes.cnpq.br/8471490865570822

Mônica Simões Florêncio
UPE – Universidade de Pernambuco
Recife – Pernambuco
http://lattes.cnpq.br/9617440675997118

Igor Cassimiro dos Santos
EREM Des.Antônio da Silva Guimarães,
Secretaria de Educação Pernambuco
Cabo de Santo Agostinho – Pernambuco
http://lattes.cnpq.br/1333629504973997

RESUMO: No ensino médio leciona-se a mitose como conteúdo da divisão celular abordada em citologia, porém nem sempre é fácil a abstração desse conteúdo pelo estudante. Estudos demonstram a eficácia dos modelos citológicos usados como recurso didático na melhoria do aprendizado, além de vídeos sobre a estrutura celular e seu ciclo, bem como ilustrações e o microscópio. Qualquer que seja a metodologia aplicada pelo docente, sempre se recorre a representações visuais. Como apoio na abordagem da citologia, alguns docentes obtêm imagens de atlas citológicos e histológicos para nível superior. O presente estudo consiste na elaboração de uma sequência didática e um atlas comentado que sirvam como ferramenta auxiliar na abordagem do conteúdo de divisão celular mitótica no ensino da biologia para as turmas de nível médio da educação básica, demonstrando as alterações celulares que ilustrem a conexão célula-ambiente-saúde. Para isso procedeu-se o cultivo do meristema radicular de *Allium cepa L.* (cebola), em condições normais e sobre estresse químico provocado por sulfato de cobre agente genotóxico e mutagênico, registrando por fotografias as fases da mitose normal e alterada. O presente estudo e proposições almejam desenvolver o estudante como ser integral através da pesquisa experimental e

da reflexão sobre a ação antrópica nos ecossistemas e na saúde humana, estimulando o desenvolvimento das diversas habilidades baseadas nas múltiplas facetas da aprendizagem do indivíduo. Assim, tanto a sequência didática quanto o atlas estimulam a elaboração de alternativas que legitimem o protagonismo estudantil, promovendo sua autonomia na consolidação do processo de ensino-aprendizagem em suas múltiplas dimensões de forma dinâmica, permitindo demonstrar seu posicionamento ético-cidadão e firmar-se sócio-histórico-culturalmente.
PALAVRAS - CHAVE: Sequência didática; Mitose; Saúde e ambiente; Célula e saúde.

GENOTOXIC, CYTOXIC AND MUTAGENIC CHANGES: A CONTENT TO BE ILLUSTRATED AND WORKED IN HIGH SCHOOL

ABSTRACT: In high school, mitosis is taught as content of the cell division approached in cytology, but it is not always easy to abstraction of this content by the student. Studies demonstrate the effectiveness of cytological models used as a didactic resource in improving learning, as well as videos about cell structure and its cycle, as well as illustrations and the microscope. Whatever the methodology applied by the teacher, one always resorts to visual representations. In support of the cytology approach, some teachers take higher-level images of cytological and histological atlases. The present study consists of the elaboration of a didactic sequence and a commented atlas that will serve as an auxiliary tool in the approach of the mitotic cell division content in the teaching of biology to the middle school classes, demonstrating the cellular alterations that illustrate the cell-environment-health connection. For this, the *Allium cepa* L. root meristem (onion) was cultivated under normal conditions and under chemical stress caused by genotoxic and mutagenic copper sulfate, recording the phases of normal and altered mitosis by photographs. The present study and propositions aim to develop the student as an integral being through experimental research and reflection on anthropic action in ecosystems and human health, stimulating the development of diverse skills based on the multiple facets of individual learning. Thus, both the didactic sequence and the atlas stimulate the elaboration of alternatives that legitimize the student protagonism, promoting its autonomy in the consolidation of the teaching-learning process in its multiple dimensions in a dynamic way, allowing to demonstrate its ethical-citizen positioning and to establish itself. socio-historical-culturally.
KEYWORDS: Didactic sequence; Mitosis; Health and environment; Cell and health.

1 | INTRODUÇÃO

A aprendizagem exige que o indivíduo esteja envolvido com o objeto do conhecimento e disposto a aprender, por isso, é primordial estimular a curiosidade no estudante para que ele investigue, analise, elabore hipóteses, dirima as dúvidas e estabeleça conceitos de forma crítica reflexiva. (CARVALHO, 2010).

O presente estudo é um recorte da dissertação homônima presente no repositório da UFPE (BRITO, 2019) e almeja auxiliar o ensino do conteúdo sobre o ciclo mitótico da divisão celular propondo ao professor ou professora uma sequência didática que estimule aos estudantes a analisarem o método científico através do experimento de indução de

enraizamento da cebola, preparando o laminário do meristema radicular em condições normais e sob estresse químico (CARVALHO, 2010; GUERRA; SOUZA, 2002; MACEDO, 2014).

O experimento permite visualizar a mitose em suas diferentes fases; mas, uma vez que a mera observação não representa compreensão, propomos na sequência didática e no atlas comentado "DIVISÃO CELULAR: o estudo da mitose numa conexão entre ambiente e saúde" (BRITO, 2019) que os discentes registrem, por meio de desenhos e relatórios as características da divisão celular em ambas as situações experimentais, explicando as características de cada fase da divisão, em cada situação e posteriormente elaborando a interconexão entre fatores ambientais e alterações no ciclo mitótico (CACHAPUZ *et al.*, 2005).

A escolha da citologia deve-se ao fato dela permear o estudo da biologia em diversos campos e representar um campo essencial a ser aprendido na educação básica. Sua importância é seguida de dificuldades em relação à aprendizagem por parte dos estudantes porque exige que o estudante transponha estruturas microscópicas e moleculares peculiares da morfologia celular para uma percepção macroscópica (BRASIL, 2018; SOUZA; MESSEDER, 2017).

Consultando os portais de periódicos CAPES e PubMed, com descritores referentes aos recursos didáticos que dão suporte ao lecionar os conteúdos desse campo científico, percebe-se que grande parte dos trabalhos são centrados na criação de modelos celulares através do suporte de livros didáticos (SOUZA; MESSEDER, 2017).

Contudo, não basta a mera representação celular, pois considera-se importante a contextualização do conteúdo de citologia, bem como o incentivo dos estudantes a construir a noção de que muitos danos macroscópicos têm origem na escala molecular e que alguns danos levam ao mau funcionamento ou morte celular, lesando tecidos e órgãos. Neste sentido, o estudo da citologia deve permitir que o estudante faça conexões entre os danos moleculares que podem ocorrer numa célula e a origem de processos patológicos (PAULA, 2007).

Para além disso, a citologia pode e deve fazer uma interconexão entre possíveis estressores ambientais, danos moleculares e processos patológicos. Dessa forma, a citologia deveria ser estudada não como um objetivo em si, mas no contexto amplo que integra a relação das pessoas com o meio ambiente e a repercussão do meio ambiente na saúde dos seres vivos, em especial a espécie humana. Por exemplo, é possível fazer uma conexão entre os hábitos alimentares nas sociedades industrializadas e sua repercussão na saúde. O estudo de danos no DNA pode ser uma conexão pela qual o estudante entenderia a relação entre poluição e alterações genéticas, uma vez que algumas moléculas presentes no ar, solo ou água podem causar danos genéticos em alguns organismos (TROIAN; SILVA, 2013).

A célula representa a conexão entre um meio ambiente poluído e os processos

de doenças que tal ambiente causa. Tal linha de pensamento não só contextualiza, mas também demonstra a importância da biologia celular nas ciências biológicas e na saúde. Porém, muitos docentes encontram dificuldades em fazer com que tais conexões sejam aprendidas e compreendidas pelos estudantes. Isso se dá por motivos variados que passam pela precariedade na infraestrutura escolar, por lacunas presentes na formação docente e/ou pela inadequação dos livros didáticos para uma melhor exploração desse ramo do ensino da biologia (CACHAPUZ *et al.*, 2005).

Uma vez que infraestrutura e formação docente são problemas cuja solução demanda investimentos maiores e tempo para gerar resultados, os recursos didáticos poderiam ajudar a diminuir as dificuldades em fazer as conexões célula-ambiente-saúde. Os livros didáticos podem integrar materiais que possuam ilustrações e conexões científicas com base em experimentos que possibilitem ao estudante usufruir melhor da perspectiva realista do universo celular, não só no aspecto saudável de funcionamento celular, mas também em situações de estresse ambiental (SOUZA; MESSEDER, 2017).

2 | METODOLOGIA

A elaboração da sequência didática utilizou como subsídio a Base Nacional Curricular Comum – BNCC, cujo conteúdo prima pela uniformização dos parâmetros básicos que o estudante deve obter na sua educação básica (BRASIL, 2018).

Quanto ao atlas comentado da divisão celular da mitose, antes de sua criação foi necessário efetivar o experimento conforme metodologia apresentada por Guerra e Souza (2002) para obtenção das células nas duas situações, mitose normal e mitose com alterações genotóxicas e mutagênicas.

O experimento consistiu em cultivar sementes de *Allium cepa* L. a fim de obter o meristema radicular, que possui inúmeras células em processo de divisão mitótica para registro fotográfico tanto em condições normais (Figura 1), quanto submetida a estresse químico por agentes genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos como o sulfato de cobre (Figura 2).

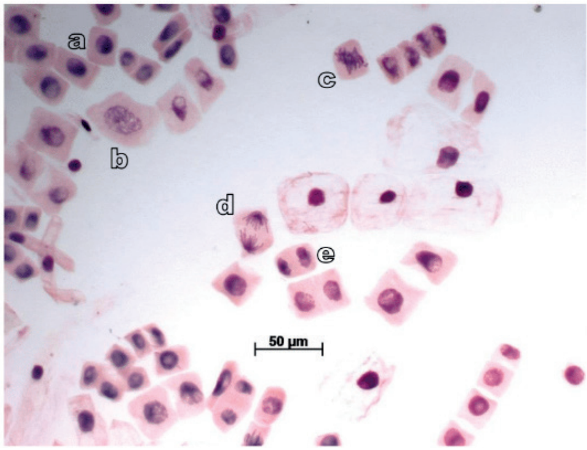


Figura 1 Mitose normal de meristema radicular de Allium cepa L. com suas fases: a – Interfase; b – Prófase; c – Metáfase; d – Anáfase; e – Telófase.

Fonte: Rosanne Lopes de Brito; Gerusa Tomaz de Aquino Beltrão; Júlio Brando Messias; Cristiano Aparecido Chagas.

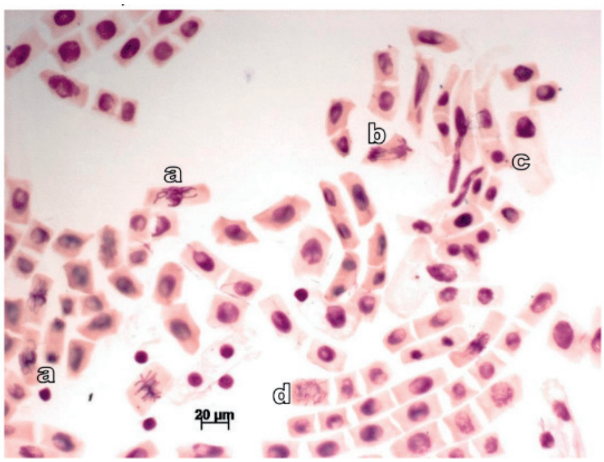


Figura 2 Mitose em células de meristema radicular de Allium cepa L. submetido a germinação em solução de sulfato de cobre. Evidenciando as alterações genotóxicas e mutagênicas: a – Metáfase com perda cromossômica; b – Anáfase com ponte cromossômica; c – Interfase com micronúcleo; d – Interfase com quebra de cromossomo.

Fonte: Rosanne Lopes de Brito; Gerusa Tomaz de Aquino Beltrão; Júlio Brando Messias; Cristiano Aparecido Chagas.

A escolha do espécime *Allium cepa* L., advém de ser um organismo disseminado na comunidade científica como parâmetro para análise de efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos. Também por possuir uma pequena quantidade de cromossomos (diploide = 16) com tamanhos adequados à visualização ao microscópio óptico e germinarem na

maioria dos meses do ano em temperatura ambiente. Outro requisito adequado deve-se a algumas reações nessa espécie serem análogas aos efeitos químicos nas células de mamíferos, possibilitando assim correlacionar com danos e/ou alterações nestas e presumir diagnósticos ambientais e farmacológicos (GUERRA; SOUZA, 2002).

Conforme, o protocolo foi estabelecido dois grupos cultivados: o primeiro grupo de sementes de *Allium cepa* L. foi germinado em placa de Petri com papel filtro embebido em água destilada, enquanto o segundo grupo de sementes foi colocado na placa de Petri com papel filtro embebido em solução de sulfato de cobre a 6 mg/L. Ambos, germinaram com eficácia (MACEDO *et al.*, 2014; MESSIAS *et al.*, 2019).

A sequência didática em conjunto com o atlas e o próprio experimento almejam motivar os estudantes a pesquisarem e refletirem criticamente sobre o efeito que determinadas substâncias, presentes em nossa alimentação e no meio ambiente podem ter nos processos celulares e em como tais efeitos podem desencadear patologias nos organismos, em especial no ser humano (BRITO, 2019).

O atlas permite a autonomia do estudante, pois estimula a refletir e a identificar a fase e a alteração apresentada (BRITO, 2019). Ainda ajuda a estabelecer uma correlação com processos patológicos que possam afetar a saúde ambiental e humana; sem tira do professor ou da professora o papel de mediador e orientador que poderá discutir e viabilizar com os estudantes a análise desse elo entre célula (estrutura microscópica) e organismo (estrutura macroscópica), permitindo que o estudante protagonize no processo de ensino-aprendizagem ao fazer as conexões com seu cotidiano (CACHAPUZ *et al.*, 2005; CARVALHO, 2010).

3 | RESULTADOS E DISCURSÕES

A sequência didática é um recurso de importância significativa que envolve a reflexão-ação do (a) professor (a) por direcionar a ação educativa. Conforme, Zabala (1998) enfatiza a importância da elaboração escrita e não apenas mental das aulas a serem ministradas. Nesse sentido, a flexibilidade da sequência didática é primordial, visto que as turmas e estudantes apresentam suas peculiaridades, assim é importante que se possa fazer adaptações a cada situação que poderá surgir no decorrer da aplicação da sequência didática.

A elaboração da sequência didática levou em consideração as habilidades conceituais, atitudinais e procedimentais pertinentes à citologia, no que se refere ao estudo do ciclo de divisão celular mitótico. Além disso, apresenta a possibilidade de aplicar o método científico como modo de construir conceitos, habilidades e competências relacionadas ao conteúdo abordado (BRASIL, 2018; ZABALA, 1998).

Para isso, a Base Nacional Curricular Comum – BNCC, foi usada como subsídio; seu conteúdo versa sobre a uniformização dos parâmetros básicos que o estudante deve

obter na sua educação. O atlas proposto prioriza a linguagem visual, cujo suporte auxiliará compreender o ciclo de divisão mitótica de modo mais concreto (BRASIL, 2018).

Quanto às competências específicas das Ciências Naturais, a proposta apresenta a investigação e avaliação de uma situação-problema, compondo a competência 3 (Figura 1), por meio da aplicação do método científico. O estudante será levado a observar, registrar e analisar o fenômeno de germinação da espécie *Allium cepa* L. em duas situações: na primeira, o estudante analisará as etapas da mitose normal, na segunda ele analisará os efeitos de um composto químico genotóxico e mutagênico no processo de divisão, que causa alterações perceptíveis quando vista ao microscópio óptico. Este procedimento se encaixa na descrição das exigências apresentadas nas competências 1 e 2 (Figura 1).

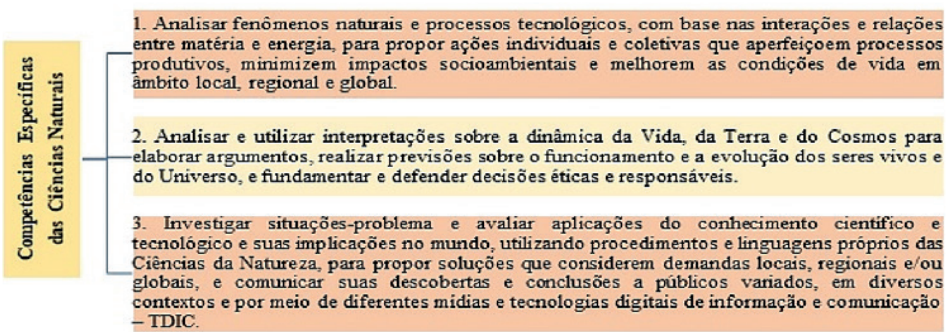


Figura 1 Descrição das competências Específicas das Ciências Naturais, propostas na BNCC para o ensino médio.

Fonte: Adaptado de BRASIL (2018, p. 553).

A elaboração da sequência didática também contemplou o despertar da “curiosidade intelectual” do estudante estabelecida na BNCC, com a aplicação do método científico, que o estimula a investigar as alterações celulares provenientes do uso de compostos químicos com ação genotóxica e mutagênica. Nesse caso, o estudante será estimulado a fazer uma análise, com reflexão crítica sobre possíveis consequências da ação antrópica na biota e nos seres humanos, remetendo a desenvolver competência 3 (Figura 2) (BRASIL, 2018).

A sequência didática explora o protagonismo estudantil sob mediação do (a) professor (a) no uso das tecnologias digitais como fonte de pesquisa para obtenção de dados em fontes confiáveis, estimulando a discussão sobre as informações obtidas, encorajando o estudante a adotar uma postura crítica, ética e responsável perante os fatos (BRASIL, 2018).

As competências específicas 1 e 2 (Figura 1) estão presentes na análise das células em duas situações: com o desenvolvimento das fases da mitose normal e sobre ação do sulfato de cobre que causou alterações genotóxica e mutagênica. Com isso, o estudante desperta a curiosidade a respeito das consequências do uso de determinadas substâncias

capazes de interferir no desenvolvimento normal do organismo; assim, cria-se na sala de aula uma atmosfera favorável à colocação deles sobre como podemos reduzir os danos advindos da ação humana, a partir das informações coletadas para subsidiar suas argumentações, assim desenvolvendo as habilidades exigidas (BRASIL, 2018).

A aplicação da sequência didática proposta requer que o professor previamente aborde conceitos iniciais de citologia como estruturas, componentes e funções celulares. Assim como, o livro proposto sobre o ciclo de divisão celular mitótico. Nas duas situações o estudante necessita compreender o método científico e sua importância na validação do conhecimento científico, estabelecendo a interligação entre a ciência e o cotidiano, como forma de garantir a manutenção da qualidade de vida do ser humano, o equilíbrio dos ecossistemas e consequentemente do Planeta (CARVALHO, 2010; ZABALA, 1998). Assim, ambos focam no contexto do ciclo de divisão celular mitótica a conexão entre célula-ambiente-saúde.

São inúmeros os agentes químicos com potencial de provocar riscos a população, cabe ao professor estimular os estudantes a pesquisarem sobre algumas dessas substâncias naturalmente existentes no ambiente e também aquelas provenientes de ações antrópicas que possam ocasionar danos à saúde de diferentes organismos; desse modo o aluno pode refletir a respeito do conhecimento existente sobre a interligação entre célula-ambiente-saúde.

Os recursos destinados ao ensino da biologia no ensino médio no que se refere a divisão celular, em geral são suplementados pelo professor com imagens obtidas de materiais direcionados ao ensino superior, que muitas vezes extrapolam as reais necessidades do público em questão. O livro "Divisão celular: o estudo da mitose numa conexão entre ambiente e saúde" (BRITO, 2019) é uma proposta para suprir a carência de materiais didáticos auxiliares destinados aos estudantes do ensino médio, como um material auxiliar capaz de vincular a célula-ambiente-saúde (PAULA, 2007).

Uma forma de estimular o aluno é através da pesquisa de algumas substâncias químicas que sejam consideradas poluentes ambientais, tanto de solo como de águas limnóticas e oceânicas. O objetivo é o de contextualizar os problemas decorrentes da ação antrópica. A pesquisa pode ser realizada em diferentes mídias sobre orientação do (a) professor (a), e deve terminar com uma lista de algumas substâncias com ação poluente (BRASIL, 2018; ZABALA, 1998).

O uso da sequência didática proposto por Zabala (1998) remete as diferentes formas de aprendizagem do indivíduo por meio de metodologias que estabeleçam múltiplas aprendizagens, assim utilizando a estratégia da roda de diálogo proposto nesse estudo devem proporcionar as conexões existentes entre alguns compostos, como o sulfato de cobre, a bioacumulação com a intoxicação de alguns seres vivos. Nessa pesquisa também devem ser discutidos processos patológicos que podem ser decorrentes dessas intoxicações, com uma reflexão sobre como tais processos patológicos devem iniciar no

nível celular/ molecular.

Subsidiado na BNCC (2018), a pesquisa em escala macro poderá ser direcionada a realidade vivenciada pelo estudante em seu contexto social, como por exemplo visualizando o dano ambiental capaz de desencadear malefícios. Diante disso, o estudante pode refletir que a substância primeiramente penetrará na célula, alterando seu funcionamento e dependendo dessa alteração prejudicar os tecidos, desencadeando danos sistêmicos ao organismo.

De acordo com Cachapuz *et al*. (2005) e Carvalho (2010) o método científico deve ser parte do universo de aprendizagem das ciências. O experimento integrante desse estudo poderá ser aplicado de modo demonstrativo após expor o objetivo do experimento, uma vez que pressupõe que devido às pesquisas realizadas deixará os estudantes cientes das consequências da metodologia. Assim a ação genotóxica e mutagênica do sulfato de cobre no espécime em questão, *Allium cepa* L. (GUERRA; SOUZA, 2002; MACEDO *et al*., 2014; MESSIAS *et al*., 2019) configura-se como um exemplo da reflexão relacionada a uma situação-problema (BRASIL, 2018).

As ilustrações contidas no livro, assim como o texto explicativo possibilitam os alunos o entendimento do ciclo celular, tanto em seu prosseguimento normal como alterado, instigando os mesmos a reconhecerem que as alterações evidenciadas nas imagens, cujas células haviam sido submetidas a um agente agressor, sem a preocupação da utilização dos termos técnicos como ponte, micronúcleo, perda e quebra (GUERRA; SOUZA, 2002; MACEDO *et al*., 2014; MESSIAS *et al*., 2019).

A BNCC (2018), estabelece algumas habilidades que o estudante deve desenvolver no aprendizado dos conteúdos referentes às Ciências Naturais, destacam-se as que podem ser exploradas utilizando a sequência didática e o livro proposto (Figura 2).

A habilidade EM13CNT104 tem como foco principal avaliação dos benefícios e riscos à saúde e ao ambiente (BRASIL, 2018), nesse sentido o livro busca essa avaliação através do uso de um agente agressor ao meio ambiente, como o sulfato de cobre, capaz de causar danos no ciclo mitótico; provocando alterações tanto de padrões citotóxicos como redução do ciclo mitótico, como genotóxicos. As alterações genotóxicas podem ser pontes cromossômicas na fase da mitose de acordo com Giacomelli (1999) as pontes resultam de aderências cromossômicas que quando múltiplas persistem da anáfase até a telófase. Ou perda de cromossomos que segundo Matsumoto e Marin-Morales (2004) pode ser consequência da adesão na anáfase que pode romper as pontes resultando na quebra do cromossomo.

A habilidade EM13CNT203 estimula a avaliar e prever efeitos de intervenções nos ecossistemas, e seus impactos nos seres vivos e no corpo humano (BRASIL, 2018; DEMO, 2011). A conveniência da escolha da mitose para temática da sequência didática e do livro, facilita estabelecer a habilidade mencionada, visto ser visível a ação tóxica do sulfato de cobre nas células meristemáticas da *Allium cepa* L., evidenciando que algumas ações

antrópicas têm efeitos indesejáveis nos ecossistemas que desencadeiam consequências aos organismos.

A habilidade EM13CNT205 tem como destaque principal interpretar resultados e realizar previsões sobre atividades experimentais, fenômenos naturais e processos tecnológicos (BRASIL, 2018). Essa habilidade está presente durante toda a proposta desse estudo, toda reflexão sugerida ao educador para estimular o estudante é subsidiada na interpretação da realização, observação e análise dos resultados obtidos na demonstração e/ou realização de um experimento científico, consolidado na literatura. Isso confirma o diz Moraes, Ramos e Galiazzi (2004) quando comenta que a aprender e ensinar são viés relevantes na educação formal.

Competência 1 -Habilidades

- (EM13CNT104) Avaliar os benefícios e os riscos à saúde e ao ambiente, considerando a composição, a toxicidade e a reatividade de diferentes materiais e produtos, como também o nível de exposição a eles, posicionando-se criticamente e propondo soluções individuais e/ou coletivas para seus usos e descartes responsáveis.

Competência 2 - Habilidades

- (EM13CNT202) Analisar as diversas formas de manifestação da vida em seus diferentes níveis de organização, bem como as condições ambientais favoráveis e os fatores limitantes a elas, com ou sem o uso de dispositivos e aplicativos digitais (como softwares de simulação e de realidade virtual, entre outros).
- (EM13CNT203) Avaliar e prever efeitos de intervenções nos ecossistemas, e seus impactos nos seres vivos e no corpo humano, com base nos mecanismos de manutenção da vida, nos ciclos da matéria e nas transformações e transferências de energia, utilizando representações e simulações sobre tais fatores, com ou sem o uso de dispositivos e aplicativos digitais (como softwares de simulação e de realidade virtual, entre outros).
- (EM13CNT205) Interpretar resultados e realizar previsões sobre atividades experimentais, fenômenos naturais e processos tecnológicos, com base nas noções de probabilidade e incerteza, reconhecendo os limites explicativos das ciências.
- (EM13CNT206) Discutir a importância da preservação e conservação da biodiversidade, considerando parâmetros qualitativos e quantitativos, e avaliar os efeitos da ação humana e das políticas ambientais para a garantia da sustentabilidade do planeta.
- (EM13CNT207) Identificar, analisar e discutir vulnerabilidades vinculadas às vivências e aos desafios contemporâneos aos quais as juventudes estão expostas, considerando os aspectos físico, psicoemocional e social, a fim de desenvolver e divulgar ações de prevenção e de promoção da saúde e do bem-estar.

Competência 3 - Habilidades

- (EM13CNT301) Construir questões, elaborar hipóteses, previsões e estimativas, empregar instrumentos de medição e representar e interpretar modelos explicativos, dados e/ou resultados experimentais para construir, avaliar e justificar conclusões no enfrentamento de situações-problema sob uma perspectiva científica.
- (EM13CNT302) Comunicar, para públicos variados, em diversos contextos, resultados de análises, pesquisas e/ou experimentos, elaborando e/ou interpretando textos, gráficos, tabelas, símbolos, códigos, sistemas de classificação e equações, por meio de diferentes linguagens, mídias, tecnologias digitais de informação e comunicação (TDIC), de modo a participar e/ou promover debates em torno de temas científicos e/ou tecnológicos de relevância sociocultural e ambiental.
- (EM13CNT303) Interpretar textos de divulgação científica que tratem de temáticas das Ciências da Natureza, disponíveis em diferentes mídias, considerando a apresentação dos dados, tanto na forma de textos como em equações, gráficos e/ou tabelas, a consistência dos argumentos e a coerência das conclusões, visando construir estratégias de seleção de fontes confiáveis de informações.
- (EM13CNT304) Analisar e debater situações controversas sobre a aplicação de conhecimentos da área de Ciências da Natureza, com base em argumentos consistentes, legais, éticos e responsáveis, distinguindo diferentes pontos de vista.
- (EM13CNT306) Avaliar os riscos envolvidos em atividades cotidianas, aplicando conhecimentos das Ciências da Natureza, para justificar o uso de equipamentos e recursos, bem como comportamentos de segurança, visando à integridade física, individual e coletiva, e socioambiental, podendo fazer uso de dispositivos e aplicativos digitais que viabilizem a estruturação de simulações de tais riscos
- (EM13CNT310) Investigar e analisar os efeitos de programas de infraestrutura e demais serviços básicos e identificar necessidades locais e/ou regionais em relação a esses serviços, a fim de avaliar e/ou promover ações que contribuam para a melhoria na qualidade de vida e nas condições de saúde da população.

Figura 2 - Seleção de algumas competências e habilidades que podem ser desenvolvidas ao trabalhar o conteúdo de citologia no ensino médio.

Fonte: Adaptado de BRASIL (2018, p. 555-560).

A habilidade EM13CNT206 ressalta a importância de discutir o quão é essencial

preservar e conservar a biodiversidade, almejando garantia a sustentabilidade do planeta (BRASIL, 2018), a proposta da sequência didática almeja estimular no estudante o desenvolvimento do senso crítico através da adoção de uma postura proativa direcionada a atitudes que contemplem o respeito às diversas formas de vida e ações que viabilizem a preservação e conservação ambiental.

Na habilidade EM13CNT301 o foco principal é a construção de questões, elaboração de hipóteses, além do desenvolvimento da capacidade de prever e estimar por meio do confronto de situações-problemas embasada no conhecimento científico (BRASIL, 2018). O ensino investigativo é excelente viés para desenvolver essa habilidade do educando, com isso o presente estudo principia por uma situação problema evidenciada no experimento científico.

A habilidade EM13CNT303 evidencia a necessidade da interpretação de textos de divulgação científica objetivando instaurar uma análise em fontes confiáveis (BRASIL, 2018). Assim, a presente proposta de sequência didática e do livro “Divisão celular: o estudo da mitose numa conexão entre ambiente e saúde” comtempla a habilidade em destaque por meio da elucidação da problemática apresentada. Para isso é importante que as discussões sejam subsidiadas com informações obtidas em fontes confiáveis, a atuação do (a) professor (a) como mediador e orientador é imprescindível para favorecer a correta interpretação desses dados.

A habilidade EM13CNT306 tem como foco principal avaliar os riscos envolvidos em atividades cotidianas (BRASIL, 2018), ambas interações didáticas – objeto desse estudo – instiga a refletir sobre a ação de toxinas na célula e nos organismos; ao submeter o estudante a analisar a importância de atribuir a si e aqueles que o cercam, atitudes que assegurem proteção em determinadas atividades do seu dia-a-dia.

Enquanto a habilidade EM13CNT310 remete a necessidade de realçar as problemáticas locais por meio da investigação e analise dos efeitos de programas de infraestrutura e demais serviços básicos (BRASIL, 2018). Concordamos que um ponto primordial é a reflexão e postura política sobre os riscos advindos de ambientes com infraestruturas precárias ou inadequadas; motivando o estudante a descrever e analisar a situação da localidade em que reside e na qual a escola está situada, detectando os riscos que possam estarem presentes e discutindo medidas que minimizem tais perigos. Andreia e Laburú (2011) comenta que o ensino investigativo possibilita que os estudantes apresentem uma participação mais ativa durante as aulas.

As habilidades e competências explanadas na BNCC (BRASIL, 2018) e destacadas no presente estudo corrobora com o artigo 35 da LDB porque ambas revelam a importância do ensino médio no aprimoramento do indivíduo nos aspectos éticos, cognitivo autônomo e primordialmente na percepção crítica a respeito dos fatos que o inserem e circundam, facilitando a compreensão das bases científico-tecnológicas na manutenção dos processos produtivos, consolidando a conexão entre teoria e prática (CARVALHO, 2010; ZABALA,

1998).

4 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho baseou-se no processo de ensino-aprendizado pelo método investigativo ao estabelecer uma situação-problema que motiva a postura cidadã e ética do estudante.

A sequência didática e o atlas comentado estimulam a pesquisa e influenciam a ação reflexiva tanto no aspecto da seleção das informações em fontes confiáveis, quanto na ponderação sobre o quão a ação humana pode ser danosa aos ecossistemas e, consequentemente, ao próprio ser humano.

Outro ponto importante dessa obra, consiste em viabilizar o desenvolvimento do estudante como ser integral, através de uma educação que o contemple em amplos e variados aspectos e atinja as múltiplas facetas das juventudes. Além disso, estimula a elaboração de alternativas que legitimam o protagonismo estudantil, promovendo sua autonomia na consolidação do processo de ensino-aprendizagem em suas múltiplas dimensões de forma dinâmica, permitindo demonstrar seu posicionamento ético-cidadão e firmar-se sócio-histórico-culturalmente.

Sendo assim, é fundamental a continuidade do estudo no que concerne a aplicação da metodologia científica pelo próprio estudante com a aplicação da sequência didática e o uso do atlas como ferramenta auxiliar do aprendizado.

REFERÊNCIAS

ANDREIA, F. Z.; LABURÚ, C. E. **Atividades investigativas no ensino de ciências**: aspectos históricos e diferentes abordagens. Ensaio Pesquisa em Educação em Ciências, Belo Horizonte, v. 13. n. 3. pp. 67-80, 2011. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/1295/129521755005.pdf >. Acesso em: 30 jul 2019.

BRASIL. Ministério da Educação e Cultura. **Base Nacional Comum Curricular – BNCC**. Brasília: MEC, 2018. 600p. Disponível em: http://basenacionalcomum.mec.gov.br/images/BNCC_EI_EF_110518_versaofinal_site.pdf. Acesso em: 06 mar. 2019.

BRITO, R.L. **Alterações genotóxicas, citotóxica e mutagênicas**: um conteúdo a ser ilustrado e trabalhado no ensino médio. 2019. 96 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ensino da Biologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2019. Disponível em: < https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/37842/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Rosanne%20Lopes%20de%20Brito.pdf>. Acesso em: 27 jan 2021.

CACHAPUZ, A. *et al.* **A necessária renovação do ensino das ciências**. São Paulo, SP: Cortez, 2005. 263p.

CARVALHO, A.M.P. **Ensino de ciência**: unindo a pesquisa e a prática. São Paulo, SP: Cengage Learning, 2010. 154p.

FISKEJO, G. **The *Allium* test as a standart in environmental monitoring**. Hereditas. London, v.

102, n. 1, p. 99-112, 1985. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x/pdf. Acesso em: 04 jan 2018.

GIACOMELLI, F. R. B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de Aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região Sul**. 1999. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 1999. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87675/hoshina_mm_me_rcla.pdf.txt?sequence=2. Acesso em: 28 jul. 2019.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Rebeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002. 132p. Disponível em: http://www.ensp.fiocruz.br/portalensp/_uploads/documentos-pessoais/documento-pessoal_52172.pdf. Acesso em: 04 jan 2018.

MACEDO, J. F.M. *et al*. **Estudo da genotoxicidade do extrato de *Abelmoschus esculentus* (quiabo) pelo teste *Allium cepa***. Revista Saúde em Foco, Teresina, v. 1, n. 1, art. 2, p. 15-28. Jan./Jul., 2014.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. **Mutagenic Potential Evaluation of the Water of a River That Recei es Tannery Effluent Using the *Allium cepa* Test System**. 2004. The Japan Mendel Society: Cytologia, Tóquio, v. 69, n. 4, p. 399–408, 2004. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/67987/2-s2.0-15244361365.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 28 jul 2019.

MESSIAS, J. B. *et al*. **Citogenotoxicidade e mutagenicidade do sulfato de cobre em diferentes variedades de *Allium cepa* Linn**. In: SILVA NETO, Benedito Rodrigues da. (Org.). Conceitos básicos da genética. Ponta Grossa: Atena, 2019. v. 1, p. 54-65.

MORAES, Roque; RAMOS, Maurivan G.; GALIAZZI, Maria do Carmo. Pesquisar e aprender em Educação Química: alguns pressupostos teóricos. Engenharia Ambiental, Espírito Santo do Pinhal, v.1, n.1, p. 57-64, jan./dez. 2004. Disponível em: <http://usuarios.upf.br/~adelauxen/textos/pesquisareaprender.pdf >. Acesso em: 30 jul 2019.

PAULA, S. R. **Ensino e aprendizagem dos processos de divisão celular no Ensino Fundamental**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São, 2007. 113p. Disponível em: http://www.teses.usp.br/index.php?option=com_jumi&fileid=11&Itemid=76&lang=ptbr&filtro=sabrina%20ribeiro. Acesso em: 29 maio 2019.

SOUZA, E.; MESSEDER, J.C. **Citologia em sala de aula: um modelo celular pensado para todos**. In: ENPEC, 11., 2017, Florianópolis. Anais [...] Florianópolis, SC: UFSC, 2017. 13p. Disponível em: http://www.abrapecnet.org.br/enpec/xi-enpec/anais/resumos/R0082-1.pdf. Acesso em: 04 jan. 2018.

TROIAN, E. A.; SILVA, L. B. **Análise da influência do polimorfismo Lys939Gln do gene XPC sobre as taxas de danos no DNA de trabalhadores expostos a agrotóxicos**. In: SALÃO UFRGS, 2013. Anais [...] [Porto Alegre]: UFRGS, 2013. Poster. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/92795/Poster_31841.pdf?sequence=2.>.Acesso em: 06 mar. 2019.

ZABALA, Antoni. **A prática educativa**: como ensinar. Porto Alegre: Artmed, 1998. 224p.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DO CROMOSSOMO PHILADEPHIA EM TUMORES NÃO-SÓLIDOS: UMA ABORDAGEM CITOGENÉTICA AO CÂNCER

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 28/12/2020

Caio Bezerra Machado
Universidade Federal do Ceará. Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética. Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/9820185993338831

Beatriz Maria Dias Nogueira
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética. Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/5638783251934431

Adrhyann Jullyanne de Sousa Portilho
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética. Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/8626175751127592

Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética. Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/0701679734111287

Maria Elisabete Amaral de Moraes
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética. Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/3565768281344086

Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética. Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/3191425896154552

RESUMO: Tumores não-sólidos são um grupo de doenças relacionadas a desordens em precursores hematológicos na medula óssea, levando a proliferação exacerbada de células de linhagem leucocitária no sangue periférico. No contexto das leucemias é importante de se conhecer e entender a história do cromossomo Philadephia que, desde primeiramente reportado, serviu como modelo para estudo das anormalidades citogenéticas na oncogênese. Se caracterizando como uma translocação recíproca entre os genes *ABL* e *BCR* nos cromossomos 9 e 22, respectivamente, foi descrito pela primeira vez em 1960 como um achado típico para leucemias mielóides crônicas, sendo também identificado em outros subtipos leucêmicos posteriormente. Após algumas décadas de estudos, a caracterização molecular precisa desta região quimérica foi alcançada, deixando claro a sua via na oncogênese através da ativação constitutiva de tirosina-quinases e permitindo o desenvolvimento de terapias alvo-específicas altamente eficazes. O cromossomo Philadelphia se configura como um marco da medicina oncológica e do diagnóstico molecular de neoplasias de uma maneira geral, ainda sendo relevante na prática clínica atual e impulsionando o surgimento novas estratégias para abordagem

e manejo desta alteração citogenética.
PALAVRAS - CHAVE: Cromossomo Philadelphia; Tirosina Quinase BCR-ABL; História da Medicina

THE PHILADELPHIA CHROMOSOME CHARACTERIZATION IN NON-SOLID TUMORS: A CYTOGENETIC APPROACH TO CANCER

ABSTRACT: Non-solid tumors are a group of diseases related to disorders in hematological precursors in the bone marrow, leading to an exacerbated proliferation of leukocyte lineage cells in the peripheral blood. In the context of leukemias, it is important to know and understand the history of the Philadelphia chromosome which, since first reported, served as a model for studying cytogenetic abnormalities in oncogenesis. Characterized as a reciprocal translocation between the *ABL* and *BCR* genes on chromosomes 9 and 22, respectively, it was first described in 1960 as a typical finding for chronic myeloid leukemias, being also identified in other leukemic subtypes later. After a few decades of studies, the precise molecular characterization of this chimeric region has been elucidated, allowing the understanding of its pathway in oncogenesis through the constitutive activation of tyrosine kinases and leading the way to the development of highly effective target-specific therapies. The Philadelphia chromosome consolidates itself as a milestone in oncological medicine and in the molecular diagnosis of neoplasms in general, still being relevant in current clinical practice and driving the emergence of new strategies to approach and manage this cytogenetic alteration.
KEYWORDS: Philadelphia Chromosome; BCR-ABL Tyrosine Kinase; History of Medicine.

EPIDEMIOLOGIA E RELEVÂNCIA DOS TUMORES NÃO-SÓLIDOS

Tumores não-sólidos são um grupo de doenças relacionadas a desordens em precursores hematológicos na medula óssea, levando a proliferação exacerbada de células de linhagem leucocitária no sangue periférico. Também podendo ser denominados como malignidades hematológicas, estes tumores não-sólidos incluem desordens como síndromes mieloproliferativas, linfomas e leucemias crônicas e agudas (JULIUSSON; HOUGH, 2016; LICHTMAN, 2008).

O relato mais antigo de leucemia está associado com o pesquisador Velpeau no ano de 1827, no qual relatou o caso de uma mulher de 63 anos que apresentava sintomas como febre, estômago inchado e fraqueza geral. Após a morte da paciente, Velpeau pôde observar através da autopsia que a mesma apresentava esplenomegalia e seu sangue era espesso. Apesar das evidências observadas pelo pesquisador, não se pode definir ao certo o diagnóstico para leucemia pois haviam poucas evidencias fornecidas na publicação e nenhum nome oficial foi atribuído a doença na época (GOLDMAN; DALEY, 2007; THOMAS, 2013).

Embora a leucemia já houvesse sido citada anteriormente, o pesquisador Virchow quem utilizou o termo “leukhemia” pela primeira vez em 1847, a palavra provém do grego “leukos” que significa branco e “heima” que significa sangue, referindo-se a “sangue

branco”. Bennett sugeriu o termo “leucocitemia” no mesmo ano (GOLDMAN; DALEY, 2007; THOMAS, 2013).

Estatísticas para previsão da incidência de câncer no mundo indicam que mais de um milhão de pessoas são afetadas anualmente por malignidades hematológicas e que, entre estes casos, mais de seiscentas mil mortes são reportadas (BRAY *et al.*, 2018).

Apesar do número ainda expressivo de casos e óbitos, o tratamento das neoplasias hematológicas evoluiu aceleradamente no decorrer dos anos, culminando atualmente em terapias moleculares com alvos específicos (LICHTMAN, 2008; SHIMADA, 2019). Neste contexto, é importante de se conhecer e entender a história do cromossomo Philadelphia que, desde primeiramente reportado, serviu como modelo para estudo das anormalidades citogenéticas na oncogênese (ZHOU *et al.*, 2018).

O cromossomo Philadephia se caracteriza como uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (**Figura 1**) dando origem a região génica quimérica *BCR-ABL* que expressa diferentes isoformas de tirosina-quinases com características de ativação constitutiva. Esta hiperatividade de tirosina-quinase favorece processos potenciadores da oncogênese como a proliferação celular exacerbada e inibição da senescência e apoptose (KANG *et al.*, 2016).

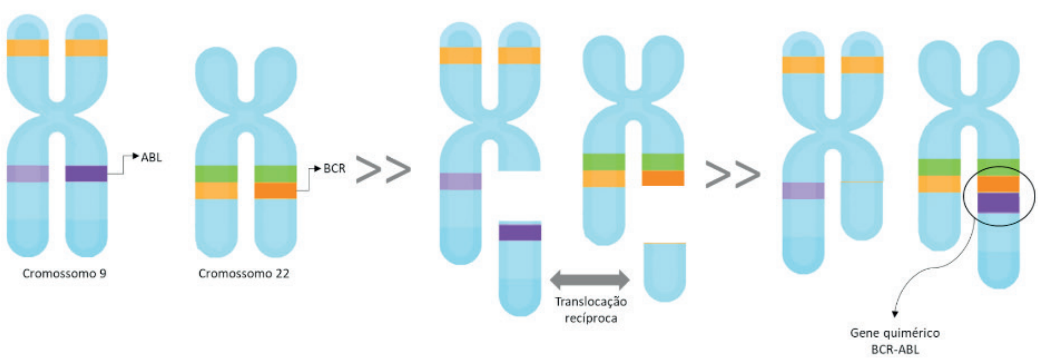


Figura 1: Translocação entre os braços longos do cromossomo 9 e 22, dando origem ao cromossomo Philadephia e sua região quimérica *BCR-ABL*.

Fonte: Autoria Própria (2020).

O AVANÇO DAS ANÁLISES CITOGENÉTICAS

Descrito pela primeira vez em 1960 por Peter Nowell e David Hungerford, a rudimentaridade das primeiras técnicas citogenéticas não permitiu uma identificação precisa da natureza deste cromossomo. Observado pelos pesquisadores em amostras de pacientes acometidos por leucemia mielóide crônica, e descrito como um cromossomo

diminuto, acreditavam se tratar de uma deleção em uma porção do braço longo do que seria, corretamente à época, o cromossomo 21 (NOWELL, 1962; NOWELL; HUNGERFORD, 1960).

Por estar presente em mais de 90% dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica, esta foi a primeira alteração citogenética associada à um câncer a ser reportada, entretanto, a incapacidade dos estudos da época de identificar alterações cromossômicas consistentes em outros tumores, sólidos e não-sólidos, acabou por invalidar a ideia de que alterações cromossômicas poderiam, de alguma forma, influenciar na carcinogênese, renegando a este achado a atenção merecida (NOWELL, 2007; NOWELL; HUNGERFORD, 1961).

Apenas ao fim da década de 1960 e início de 1970 que as técnicas de citogenética avançaram a ponto de permitir um estudo mais detalhado da estrutura cromossomal. Em 1971, Caspersson e colaboradores descreveram o padrão de bandeamento de todos os 24 cromossomos humanos durante a metáfase, permitindo então a melhor visualização de alterações estruturais como translocações e inversões que, até então, eram apenas teorizadas (CASPERSSON; LOMAKKA; ZECH, 1971; GERSEN, 2013).

Neste mesmo período, mudanças de nomeclatura, devido a consolidação da Síndrome de Down como “trissomia do 21”, permutaram as denominações entre os cromossomos 21 e 22, tornando agora o cromossomo Philadephia em uma alteração no braço longo do cromossomo 22 (GERSEN, 2013).

Em 1973, utilizando-se de técnicas de bandeamento recém aprimoradas combinando colorações de quinacrina mostarda e Giemsa, Janet Rowley analisou amostras de pacientes acometidos por leucemia mielóide crônica em diferentes fases da doença e observou material fluorescente adicional na extremidade do cromossomo 9 de células leucêmicas portadoras do cromossomo Philadephia. Pela primeira vez foi proposto que o cromossomo Philadephia na realidade seria formado por uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, não sendo apenas uma deleção de material genético, e que esta translocação seria determinante ao início da doença, ao invés de uma consequência da mesma (ROWLEY, 1973).

O AVANÇO DAS ANÁLISES MOLECULARES

Após a compressão das alterações estruturais envolvidas na formação do cromossomo Philadephia, o próximo passo no estudo desta alteração foi, naturalmente, a determinação das suas bases moleculares e possíveis mecanismos de ação que estariam envolvidos na carcinogênese.

Em 1982, Klein e colaboradores identificaram, através de hibridizações por *Southern blot*, que a translocação cromossômica Philadephia se configurava na troca da região humana homóloga ao Vírus da leucemia murina de Abelson (ABL) do cromossomo 9 ao

cromossomo 22. Sabendo-se da atividade primária de tirosina-quinase exercida por ABL, a correlação com outros oncogenes conhecidos foi rapidamente estabelecida, sendo proposto que seu mecanismo para indução de malignidade deveria envolver sua hiperexpressão por ligação a uma região promotora no cromossomo 22 (KLEIN *et al*., 1982).

Buscando entender as consequências desta translocação para a estrutura cromossomal, em 1984 um estudo liderado pelo mesmo grupo de pesquisadores identificou quebras em uma região não muito longa do cromossomo 22 em pacientes com leucemia mielóide crônica e portadores do cromossomo Philadephia. Esta região de quebra, então denominada "breakpoint cluster region" (BCR), se mostrava altamente específica por não ser identificada em outros tipos de leucemias estudadas e nem mesmo nas células saudáveis de pacientes acometidos por leucemias mielóides crônicas (GROFFEN *et al*., 1984a).

Assim, a alta especificidade das regiões de quebras cromossomais e a natureza já conhecida de oncogenes com atividade de tirosina-quinase levantaram a hipótese inicial de que o quimerismo entre *BCR* e *ABL* estaria intimamente relacionado ao potencial de malignidade de células portadoras do cromossomo Philadephia (GROFFEN *et al*., 1984b).

PARA ALÉM DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Primariamente tendo sido apontado como altamente específico para leucemias mielóides crônicas, dez anos após ter sido descrito pela primeira vez, no ano de 1970, relatos de caso reportando a presença de cromossomo Philadephia também em leucemias agudas revelaram que o mecanismo carcinogênico desta translocação é, em sua realidade, muito mais complexo do que inicialmente pensado (NOWELL, 1962; PROPP; LIZZI, 1970; WHANG-PENG *et al*., 1970).

A identificação de diferentes isoformas da proteína BCR-ABL trouxe a compreensão de que os pontos de quebra em *BCR* não ocorrem de maneira aleatória, como foi primeramente especulado, e podem resultar em diferentes fenótipos (**Figura 2**), sendo o fenótipo responsável pelo desenvolvimento da leucemia linfóide aguda até mais agressivo do que o clássico causador de leucemia mielóide crônica (CLARK *et al*., 1987; KONOPKA *et al*., 1984; LUGO *et al*., 1990).

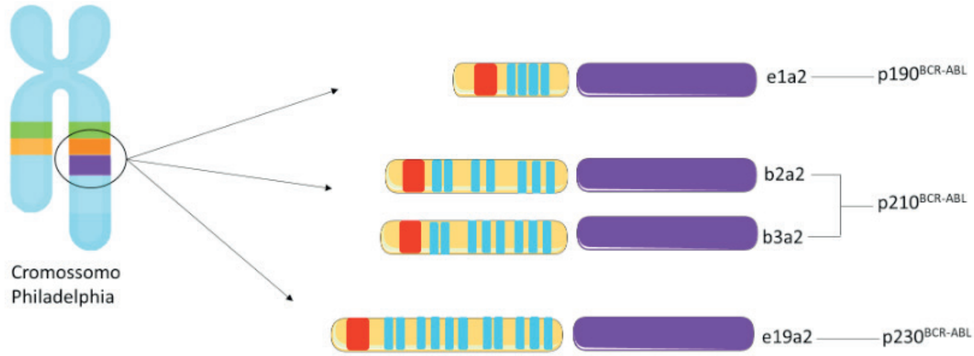


Figura 2: Representação dos diferentes pontos de quebra e fusão em *BCR* e *ABL* e possíveis isoformas proteicas transcritas.

Fonte: Autoria Própria (2020).

A relevância desta translocação na oncogênese de diferentes neoplasias hematológicas propulsionou a busca por drogas alvo-específicas capazes de inibir a atividade constitutiva de tirosina-quinase proveniente de BCR-ABL, tendo tido sucesso clínico com o desenvolvimento do inibidor hoje conhecido como Mesilato de Imatinibe e, mais tardiamente, com o surgimento de inibidores de segunda e terceira geração capazes de contornar possíveis resistências das células tumorais (DRUKER *et al.*, 2001; ROSSARI *et al.*, 2018)an inhibitor of the kinase could be an effective treatment for CML. METHODS We conducted a phase 1, dose-escalating trial of STI571 (formerly known as CGP 57148B.

Atualmente, o cromossomo Philadephia se configura como um marco da medicina oncológica e do diagnóstico molecular de neoplasias de uma maneira geral. Ainda sendo relevante na prática clínica, novas estratégias para abordagem e manejo desta aberração citogenômica continuam a surgir e inovar a medicina e a vida de pacientes a cada dia (ROSSARI *et al.*, 2018)22.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por tornarem possível que este trabalho fosse realizado.

REFERÊNCIAS

BRAY, Freddie *et al.*. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 Nov 2018.

CASPERSSON, Torbjorn; LOMAKKA, Gosta; ZECH, Lore. **The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes — distinguishing characters and variability**. Hereditas, v. 67, n. 1, p. 89–102, 2 Set 1971.

CLARK, Steven S. *et al.*. **Unique forms of the abl tyrosine kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL**. Science, v. 235, n. 4784, p. 85–88, 2 Jan 1987.

DRUKER, Brian J. *et al.*. **Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia**. New England Journal of Medicine, v. 344, n. 14, p. 1031–1037, 5 Abr 2001.

GERSEN, Steven L. **History of clinical cytogenetics**. The Principles of Clinical Cytogenetics, Third Edition. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 3–8.

GOLDMAN, John M.; DALEY, George Q.. **Chronic Myeloid Leukemia — A Brief History**. Myeloproliferative Disorders. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 1–13.

GROFFEN, John *et al.*. **Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22**. Cell, v. 36, n. 1, p. 93–99, Jan 1984a.

GROFFEN, John *et al.*. **The human c-abl oncogene in the philadelphia translocation**. Journal of Cellular Physiology, v. 121, n. 3 S, p. 179–191, 1984b.

JULIUSSON, Gunnar; HOUGH, Rachael. **Leukemia**. Progress in Tumor Research, v. 43, p. 87–100, 2016.

KANG, Zhi Jie *et al.*. **The philadelphia chromosome in leukemogenesis**. Chinese Journal of Cancer. [S.l.]: BioMed Central Ltd. , 27 Maio 2016

KLEIN, Annelies *et al.*. **A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia**. Nature, v. 300, n. 5894, p. 765–767, Dez 1982.

KONOPKA, James B.; WATANABE, Susan M.; WITTE, Owen N.. **An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity**. Cell, v. 37, n. 3, p. 1035–1042, Jul 1984.

LICHTMAN, Marshall A. **Battling the Hematological Malignancies: The 200 Years' War**. The Oncologist, v. 13, n. 2, p. 126–138, Fev 2008.

LUGO, Tracy G. *et al.*. **Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products**. Science, v. 247, n. 4946, p. 1079–1082, 2 Mar 1990.

NOWELL, C. **The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia**. Blut Zeitschrift für die Gesamte Blutforschung, v. 8, n. 2, p. 65–66, Abr 1962.

NOWELL, Peter C. **Discovery of the Philadelphia chromosome: A personal perspective**. Journal of Clinical Investigation. [S.l.]: American Society for Clinical Investigation. , 1 Ago 2007

NOWELL, Peter C.; HUNGERFORD, David A.. **Chromosome studies in human leukemia. ii. chronic granulocytic leukemia**. Journal of the National Cancer Institute, v. 27, n. 5, p. 1013–1035, 1961.

NOWELL, Peter C.; HUNGERFORD, David A.. **Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes**. Journal of the National Cancer Institute, v. 25, n. 1, p. 85–109, 1960.

PROPP, S.; LIZZI, Frank A.. **Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia.** Blood, v. 36, n. 3, p. 353–360, 1970.

ROSSARI, Federico; MINUTOLO, Filippo; ORCIUOLO, Enrico. **Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: From chemical development to clinical efficacy**. Journal of Hematology and Oncology. [S.l.]: BioMed Central Ltd. , 20 Jun 2018

ROWLEY, Janet D.. **A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining**. Nature, v. 243, n. 5405, p. 290–293, 1973.

SHIMADA, Akira. **Hematological malignancies and molecular targeting therapy**. European Journal of Pharmacology. [S.l.]: Elsevier B.V. , 5 Nov 2019

THOMAS, Xavier. **First contributors in the history of leukemia**. World Journal of Hematology, v. 2, n. 3, p. 62, 2013.

WHANG-PENG, J. *et al*.. **Cytogenetic studies in acute myelocytic leukemia with special emphasis on the occurrence of Ph1 chromosome.** Blood, v. 36, n. 4, p. 448–457, 1970.

ZHOU, Ting; MEDEIROS, L. Jeffrey; HU, Shimin. **Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1**. Current Hematologic Malignancy Reports. [S.l.]: Current Science Inc. , 1 Dez 2018

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE FRUTOS DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*)

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 07/12/2020

Ana Valéria Costa da Cruz
Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella-CCN
Teresina, Piauí, Brasil
https://orcid.org/0000-0001-6980-833X

Beatriz da Silva Rodrigues
Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella-CCN
Teresina, Piauí, Brasil
https://orcid.org/0000-0002-1608-0864

Amando Oliveira Matias
Universidade Federal do Piauí, Campus Amílcar Ferreira Sobral-CAFS Floriano, Piauí, Brasil
https://orcid.org/0000-0003-1495-6903

Michelli Ferreira dos Santos
Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes Barros Picos, Piauí, Brasil
https://orcid.org/0000-0001-7668-0864

Clarissa Gomes Reis Lopes
Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella-CCN
Teresina, Piauí, Brasil
https://orcid.org/0000-0001-7290-4576

Angela Celis de Almeida Lopes
Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella-CCA
Teresina, Piauí, Brasil
https://orcid.org/0000-0002-9546-5403

Sérgio Emílio dos Santos Valente
Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella-CCN
Teresina, Piauí, Brasil
https://orcid.org/0000-0003-2953-7330

Marcones Ferreira Costa
Universidade Federal do Piauí, Campus Amílcar Ferreira Sobral-CAFS Floriano, Piauí, Brasil
https://orcid.org/0000-0001-8210-2673

RESUMO: A caracterização morfológica é uma das ferramentas que auxilia na determinação da diversidade genética entre as populações de uma espécie. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a biometria e a diversidade fenotípica de duas populações de macaúba (*Acrocomia aculeata*) no estado do Maranhão, Brasil. As variáveis analisadas foram: comprimento, diâmetro, peso e relação comprimento/diâmetro dos frutos. Em seguida, procederam-se as análises estatísticas univariadas, que compreenderam medidas de posição, dispersão e assimetria. Os resultados obtidos a partir das análises univariadas evidenciam a presença de variação fenotípica. A diversidade foi estimada levando em consideração os resultados obtidos da caracterização física dos frutos. A partir, da matriz de distância euclidiana, aplicou-se a técnica UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*), que reuniu as palmeiras em quatro grupos, de modo que a obtenção de grupos distintos indica presença de variabilidade genética no material coletado. A análise de componentes principais, do mesmo

modo que a método de agrupamento UPGMA confirmaram a maior divergência do genótipo 12 em relação às demais macaúbas, sendo que o mesmo apresentou as maiores medidas para peso dos frutos. Deste modo, as variáveis biométricas quantificadas são eficazes na distinção da macaúba, sendo assim, são importantes marcadores morfológicos que podem auxiliar na diferenciação de genótipos e contribuir para estudos de divergência genética.
PALAVRAS - CHAVE: Biometria, caracterização, morfologia dos frutos.

MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF MACAÚBA FRUITS (*Acrocomia aculeata*)

ABSTRACT: Morphological characterization is tools that helps in determining genetic diversity among populations of a species. In this sense, the objective of this study was to evaluate the biometrics and morphological diversity of two populations of macauba (*Acrocomia aculeata*) in the state of Maranhão, Brazil. The variables analyzed were: length, diameter, weight and length / diameter ratio of the fruits. Then, univariate statistical analyzes were performed, which comprised measures of position and measures of dispersion and asymmetry. The results obtained from the univariate analyzes showed the presence of phenotypic variation. Diversity was estimated taking into account the results of the physical characterization of fruits. From the Euclidean distance matrix, the UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) technique was applied, which gathered the palm trees in four groups, so that obtaining distinct groups indicates the presence of genetic variability in the collected material. The principal component analysis, in the same way as the UPGMA clustering method, confirmed the greatest divergence of genotype 12 in relation to the other macaubas, with the same having the greatest measures for fruit weight. Thus, the biometric variables are quantified effective in macaúba distinction, therefore, are important morphological markers that can help to differentiate genotypes and contribute to studies of genetic divergence.
KEYWORDS: Biometry, characterization, fruit morphology.

INTRODUÇÃO

Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.) é uma palmeira tropical da família Arecaceae nativa da América do Sul, seu fruto possui alto teor de óleo, que apresenta características favoráveis para a produção de biodiesel (Rencoret et al., 2018).

Uma única planta apresenta de 2 a 8 cachos, com um número de frutos por panícula variando de 250 a 500, e rende entre 25.000 e 40.000 kg de frutos. No Brasil, *A. aculeata* é encontrada principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro- Oeste (da Silva et al., 2015).

Uma elevada variação morfológica é observada nas diferentes espécies de palmeiras tropicais, em relação às características físicas dos frutos, como é o caso da macaúba. Nesse sentindo, estudos relacionados à biometria de frutos fornecem importantes informações para auxiliar na caracterização das espécies e desempenha um papel importante na detecção da variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie (Silva et al., 2018; Rosa et al., 2018; Costa et al., 2020). Apesar da importância desses estudos, a

utilização desta abordagem ainda não é comum.

Fundamentando-se da hipótese que há variação morfológica nos frutos de macaúba e que a partir da realização de estudos relacionados à biometria é possível obter informações que servirão de base para programas de melhoramento e conservação desse recurso genético, o objetivo deste estudo foi avaliar a biometria e diversidade morfológica de duas populações de macaúba (*Acrocomia aculeata*) no estado do Maranhão, Brasil.

METODOLOGIA

A amostra de estudo foi composta por duas populações naturais de *A. aculeata* (Jacq.) coletadas em duas áreas no município de Fortuna, Maranhão, Brasil (População da Mata e População da Quinta). A população da Mata corresponde a uma floresta estacional semidecidual (Reserva ecológica) com Latitude: 5°44'58,452"S e Longitude: 44°9'35,67"W. Esta área corresponde a um fragmento de cerca de 100 hectares à margem da antiga lagoa de Fortuna, que foi degradada e transformada em açude.

A população da Quinta, Latitude: 5°44'47,652" S; Longitude: 44°8'30,9" W é uma área usada como pasto de gado bovino e caprino. A área possui aproximadamente 5 hectare e o acesso é através de uma ladeira íngreme, assoreada pela força da água das chuvas.

A amostragem se deu de forma aleatória, onde foram incluídos 200 frutos de dez macaúbas de cada população. De acordo com Manfio et al. (2011) e Vianna et al. (2017), a avaliação de quatro frutos em uma população é suficiente para estimar as características estudadas.

A coleta dos frutos foi realizada em setembro de 2019, os mesmos estavam em fase de maturação, sendo retirado um cacho por planta com o auxílio de um podão, colocados em sacos de náilon e levados para o Laboratório de Ecofisiologia e Biologia da Conservação do Centro de Ciências da Natureza II da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Piauí, Brasil, onde foram feitas avaliações físicas individuais de cada fruto, com base nos descritores preconizados por Vianna e colaboradores em 2017.

As variáveis analisadas foram: comprimento do fruto, que representa a medida do diâmetro longitudinal externo; o diâmetro do fruto, que consiste na medida referente ao diâmetro transversal externo; o peso fruto que é determinado pela massa fresca e a razão do comprimento / diâmetro (C/D) dos frutos, considerando que a relação $C/D < 1$ indica forma plana, $C/D > 1$ ovoide e $C/D = 1$ globosa. As medidas de comprimento e diâmetro foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital e expressas em centímetros (cm). Para as medidas de massa foi utilizada balança digital de precisão expressa em gramas (g).

Os dados biométricos foram analisados por meio de estatísticas univariadas, que compreenderam medidas do centro da distribuição (valores mínimos e máximos, e

média) e medidas de dispersão e assimetria (coeficientes de variação, de assimetria e curtose). Os valores de referência adotados para o coeficiente de assimetria foram: S < 0 distribuição assimétrica à esquerda e S > 0 distribuição assimétrica à direita. Para o coeficiente de curtose foram: K > 3 (leptocúrtica) distribuição mais "afilada" que a normal e K < 3 (platicúrtica) distribuição mais achatada do que a normal, conforme descrito por Silva et al. (2007).

A normalidade dos dados biométricos foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilkw, como os dados não apresentavam distribuição normal aplicou-se a correlação não paramétrica de Spearman (rs). Foram estimadas as medidas de diversidade genética a partir das variáveis biométricas entre os 10 plantas de cada população (10 plantas da população da Mata e 10 plantas da população da Quinta), pelo método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) utilizando a matriz de distância euclidiana simples. A análise da dispersão gráfica dos componentes principais e o método UPGMA referentes ao agrupamento dos indivíduos das duas populações com base nos descritores avaliados foram obtidos utilizando a plataforma computacional R (R Development Core Team, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir das análises univariadas evidenciam a presença de variação fenotípica entre os indivíduos das duas populações. As medidas de posição e dispersão para cada variável biométrica podem ser observados na tabela 1.

Com relação ao comprimento do fruto verificou-se uma amplitude de variação de 2,98 a 4,978 cm, apresentando comportamento assimétrico à direita, devido o valor do coeficiente de assimetria ser maior que zero (S>0).

Em relação aos dados de comprimento, os frutos podem ser classificados quanto a seu tamanho em: pequeno (2,1 a 2,9 cm), médio (3,0 a 3,8 cm) e grande (3,9 a 4,6 cm). A partir dos dados amostrados 55% dos frutos apresentam tamanho médio e 45% dos frutos apresentam tamanho considerado como grande. Esses resultados são similares aos observados por Sanjinez-Argandoña e Chuba (2011) e Lescano et al. (2015) que ao realizarem a caracterização biométrica e física dos frutos encontraram valores médios de 3,468 cm de comprimento.

A característica diâmetro do fruto apresentou tendência para uma distribuição normal conforme o resultado do teste de Shapiro-Wilkw (p=0,19) com valores variando entre 3,067 a 4,951 cm. Em relação ao diâmetro 55% dos frutos amostrados são classificados como largos por apresentarem medidas entre 4,0 e 4,7 cm e 45% foram definidos como frutos intermediários com medidas entre 3,0 a 4,0 cm. Nenhum fruto foi identificado como pequeno, uma vez que não apresentaram valores de diâmetros entre 2,2 a 3,0 cm. Os resultados encontrados estão de acordo com a descrição botânica da espécie realizada por Vianna et al. (2017), que ao avaliarem 30 frutos de duas populações naturais no município

de Itapira em São Paulo, verificaram que 83,33% dos frutos têm diâmetro largo.

Na avaliação da característica peso do fruto os valores estiveram entre 10,3 a 45,77 g. Os frutos amostrados, considerando as duas populações apresentaram peso entre 10,35 e 45,77 g, de modo que 80% dos dados referentes a essa variável foi concentrada na classe muito leve com frutos pesando entre 10 e 20 g, enquanto 15% foram classificados com peso leve entre 21 a 40 g e apenas 5% foram classificados como pesados com escala de 41 a 46 g.

Estes resultados diferem dos encontrados por Vianna et al. (2017), em que 45% dos dados de massa fresca foi concentrada na classe de frutos pesados com variação de 40 e 45,5 g. Fatores como variabilidade interanual, localização, distribuição, ocorrência, variação genética e diferença de polinização entre inflorescências, podem ser os motivos que explicam a existência da variação observada do peso dos frutos nas populações (Moura et al., 2019).

Características biométricas	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	CV (%)	S	K
Comprimento do fruto (cm)	200	2,984	4,978	3,848	0,381	9,910	0,583	0,999
Diâmetro do fruto (cm)	200	3,067	4,951	3,964	0,301	7,591	0,256	0,246
Peso do fruto (g)	200	10,35	45,77	17,607	6,059	34,417	1,878	6,449
Razão (C/D)	200	0,763	1,127	0,9702	0,0526	5,418	-0,260	1,555

Tabela 1. Características biométricas de frutos de *A. aculeata*.

As avaliações para determinar o peso dos frutos são importantes, uma vez que permitem distinguir os frutos com maior quantidade de polpa, os mais valorizados pela indústria, pois apresentam os maiores valores de mercado podendo ser utilizados na alimentação humana, devido sua boa qualidade nutricional e propriedades farmacológicas (Ramírez-Hernández et al., 2011). No entanto, o maior interesse na exploração dos frutos em *A. aculeata* é pelo seu potencial na produção de óleo para biocombustível (Lopes et al., 2018).

Os valores para a característica razão (C/D) estiveram entre 0,76 a 1,127 cm, de modo que 85% dos frutos apresentam forma plana (C/D < 1) e 15% formado ovoide (C/D > 1) e nenhum apresentou forma globosa. De acordo com a análise da estatística descritiva (Tabela 1) a variável peso do fruto apresentou maior valor de coeficiente de variação

(34,417%), indicando alta variabilidade quando comparada com as demais características analisadas. É comum que populações de palmeiras apresentarem variações intraespecíficas para diferentes características, sendo que as diferenças ambientais e genéticas são os principais fatores atribuídos para variação observada (Mhanhmad et al., 2012; Goudel et al., 2012).

Em relação à assimetria, ocorreu distribuição à direita apenas para o peso do fruto que apresentou valores positivos, assim predominaram na amostra frutos com menor peso. As demais características apresentaram distribuição assimétrica pra a esquerda com valor de $S < 0$, evidenciando predominância de frutos com maior comprimento e diâmetro.

As características comprimento, diâmetro e razão C/D evidenciaram uma medida de curtose menor que a da distribuição normal, sendo $K < 3$. Diante disso, a função de distribuição é mais achatada, ou seja, platicúrtica, indicando dispersão dos dados em torno da média. Já a característica peso do fruto o valor do coeficiente de curtose foi $K > 3$, ou seja, leptocúrtico, indicando que existe uma grande concentração dos valores em torno da média.

Segundo a correlação de Spearman, apenas os valores diâmetro do fruto e razão C/D não foram significativos (Tabela 2). As correlações entre as variáveis: comprimento x diâmetro do fruto; comprimento x peso do fruto; razão C/D x peso do fruto e peso do fruto x diâmetro do fruto foram altas, positivas e significativas, mostrando que estas características estão fortemente relacionadas, de modo que frutos com os maiores valores de comprimento também apresentam o maior diâmetro e peso. A relação peso do fruto x razão C/D apresentou uma baixa correlação, porém significativa. Esses dados podem ser observados no gráfico de heatmap (Figura 1)

Correlação	rs
Comprimento do fruto x Diâmetro do fruto	0,832*
Comprimento do fruto x Peso do fruto	0,734*
Comprimento do fruto x Razão C/D	0,601*
Diâmetro do fruto x Peso do fruto	0,839*
Diâmetro do fruto x Razão C/D	-0,123 ^{ns}
Peso do fruto x Razão C/D	0,173*

* = $P < 0.05$; ns = não significativo.

Tabela 2- Correlação de Spearman (rs) entre as variáveis biométricas dos frutos em *A. aculeata*.

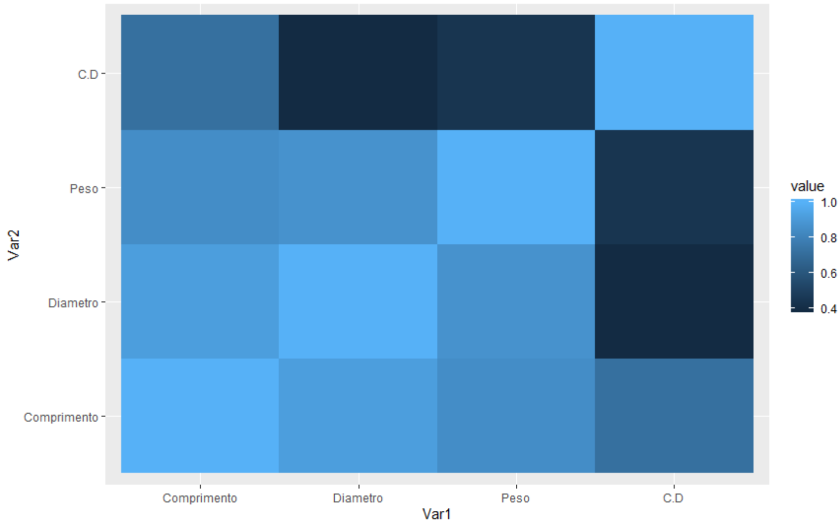


Figura 1. Gráfico *heartmap* referente às correlações entre as variáveis biométricas através da intensidade das cores. Onde, os quadrados mais escuros representam baixo grau de correlação entre as características e os quadrados mais claros representam alta correlação entre as variáveis associadas.

Estudos de biometria de frutos subsidiam importantes informações para a conservação das espécies (Lucio et al., 2019). Apesar de existirem pesquisas que discutem essa temática para algumas espécies de Arecaceae (Moura et al., 2010; Goudel et al., 2013; Silva et al., 2013; Hoffmann et al., 2014; Lescano et al., 2015; Vianna et al., 2017). Estudos em *A. aculeata* ainda são escassos, deste modo às informações obtidas no presente trabalho podem apoiar os programas de conservação genética de populações naturais.

Estimamos a diversidade genética de vinte macaúbas, dez plantas por população, levando em consideração os resultados obtidos da caracterização física dos frutos. Existe na literatura uma variedade de medidas de dissimilaridade que podem ser utilizadas em estudos de diversidade genética, a mais comum é a distância euclidiana média. A escolha do método depende da precisão desejada pelo pesquisador, da facilidade da análise e da forma como os dados são obtidos (Cruz, Carneiro e Regazzi 2014). A partir, da matriz de distância euclidiana, aplicamos a técnica UPGMA, que consiste no agrupamento para discriminar os indivíduos e separá-los em grupos, analisando um conjunto de traços inerentes a cada indivíduo, classificando-os de tal forma que exista homogeneidade dentro o grupo e heterogeneidade entre os grupos (Rosa et al., 2018).

A partir da análise do dendrograma, podemos observar a formação de quatro grupos, com representantes das duas populações em todos os grupos gerados, indicando que os indivíduos das duas populações apresentam um grau de homogeneidade para as

características fenotípicas analisadas (Figura 2). O primeiro grupo é formado apenas pela planta 12, que representa a população da Quinta. O segundo é constituído pelas plantas 11, 13, 14, 15 e 19 (População da Quinta) e pelas plantas 1 e 10 (População da Mata). O terceiro grupo é composto pelas plantas 2, 7 e 8 (População da Mata) e apenas por uma planta da população da Quinta (indivíduo 18).

O quarto e último grupo é constituído pelos membros 3, 4, 5, 6 e 9 (População da Mata) e 16, 17 e 20 (População da Quinta). Assim o grupo IV reuniu a maioria dos acessos das duas populações (40%), o grupo III alocou 20% dos indivíduos amostrados, o grupo II agrupou 35% das plantas e o grupo I reuniu somente a amostra 12, portanto este grupo é considerado como o mais divergente, uma vez que esta planta apresentou frutos com os maiores pesos, característica importante para programas de melhoramento genético.

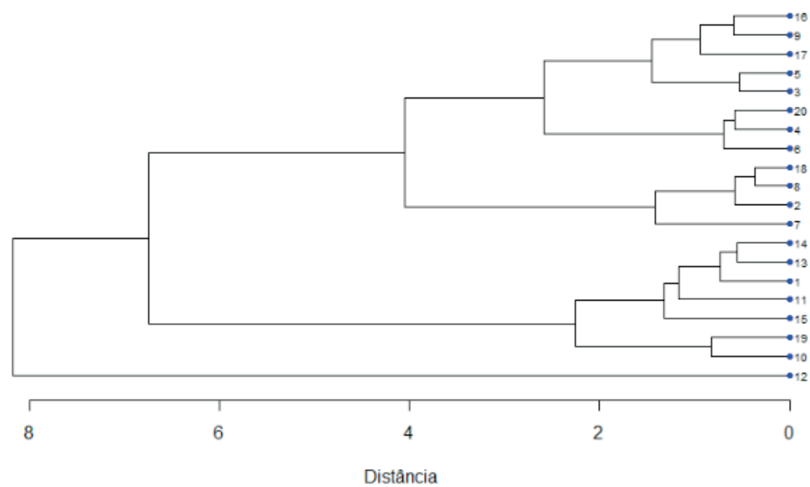


Figura 2. Dendrograma de similaridade dos indivíduos de *A. aculeata* obtido pelo método de UPGMA.

A partir da análise de componentes principais foram acumulados 96,3% da variância nos dois primeiros componentes. Em que o CP1 explicou 78,6% e o segundo CP2 17,7% da variação dos dados. De acordo com Manly (2008) nem sempre a análise de componentes principais acumula 80% da variação nos dois ou três primeiros componentes, nesse caso as variáveis originais são pouco correlacionadas. No entanto, em nosso estudo as características analisadas apresentam forte associação. Na dispersão gráfica (Figura 2) os ângulos agudos (<90º) entre as variáveis indicam correlação positiva entre as mesmas, ângulos obtusos (>90º) indicam correlação negativa e ângulos retos (=90º) indicam ausência de correlação.

Com base nos coeficientes de ponderação, no CP1 ficou evidente a contribuição das

variáveis peso e comprimento do fruto, no CP2 se destacaram as variáveis comprimento e diâmetro do fruto. O gráfico Biplot (Figura 2) com as posições relativas dos acessos e das variáveis, considerando os dois primeiros componentes, mostra que as plantas 4, 5 e 6 (População da Mata) e 20 (População da Quinta) agruparam-se por apresentarem os maiores valores para comprimento e razão C/D. E as plantas 3 e 9 (População da Mata), 16 e 17 (População da Quinta) apresentaram os maiores valores para peso e diâmetro do fruto.

Análise de Componentes Principais, do mesmo modo que a método de agrupamento UPGMA confirmaram a maior divergência do acesso 12 em relação às demais plantas amostradas nesta pesquisa. Existem trabalhos relacionados à diversidade morfológica em populações naturais de plantas que é possível observar que tanto a análise de componentes principais quanto os métodos de agrupamento UPGMA mostram semelhanças na classificação dos acessos amostrados (Costa et al., 2016; Carneiro et al., 2019).

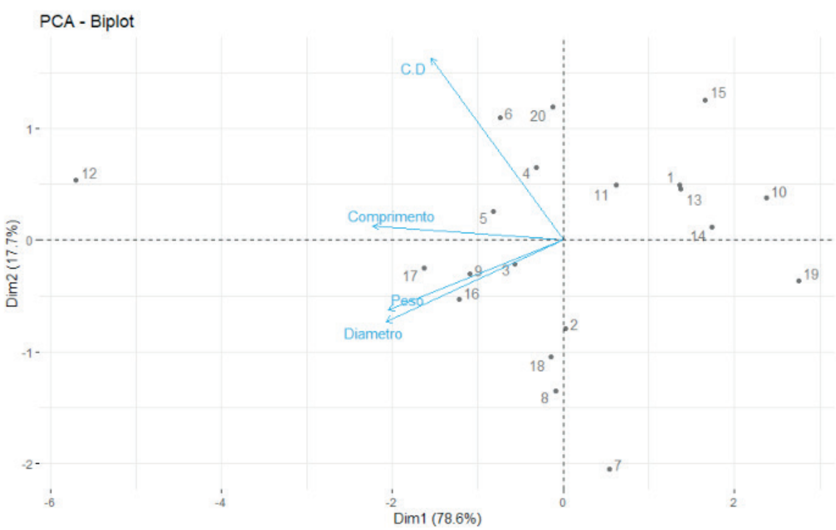


Figura 2. Dispersão gráfica via análise de componentes principais – PCA, considerando os dois primeiros componentes para quatro variáveis em duas populações naturais de *A. aculeata*.

CONCLUSÃO

Os frutos de macaúba apresentam variações fenotípicas, sendo possível observar que os frutos com maior comprimento apresentam os maiores valores para diâmetro e peso. Portanto, as variáveis biométricas quantificadas são importantes marcadores morfológicos que podem auxiliar na diferenciação de genótipos e contribuir para estudos de divergência genética da espécie.

REFERÊNCIAS

CARNEIRO, L. A. et al. Morphological characterization and genetic divergence of a cashew population in Floriano, Piauí, Brazil. **Genetics Molecular Research**, v. 18, n. 71, 2019.

COSTA, M. F. et al. Caracterização e divergência genética de populações de *Casearia grandiflora* no Cerrado piauiense. **Floresta e Ambiente**, v. 23, n. 3, p. 387-396, 2016.

COSTA, M.F. et al. Caracterização biométrica de frutos e sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) na região sul do Piauí, Brasil. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 3, p. 1432-1441, 2020.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4.ed. Viçosa: Ed. da UFV, 2014. v.1, 688p.

DA SILVA CÉSAR, Aldara et al. The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaúba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 1213-1220, 2015.

GOUDEL, Flora et al. Fruit biometry and seed germination of *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassm. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 1, p. 147-154, 2013.

HOFFMANN, J.F. et al. Butia spp.(Arecaceae): an overview. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 122-131, 2014.

LESCANO, C. H. et al. Nutrients content, characterization and oil extraction from *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. fruits. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 3, p. 113-119, 2015.

LOPES, A. S et al. The complete plastome of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] and extensive molecular analyses of the evolution of plastid genes in Arecaceae. **Planta**, v. 247, n. 4, p. 1011-1030, 2018.

LÚCIO, D.M. et al. Biometry of fruits and seeds of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) in natural populations, **Agriculture & Forestry**, v. 65, n. 1, p. 99-110, 2019.

MANFIO, C.E. et al. Repetibilidade em características biométricas do fruto de macaúba. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 70-76, 2011.

MANLY, B. F. J. **Métodos Estatísticos Multivariados**: Uma Introdução. Porto Alegre: Artmed/Bookman, 2008. 229 p

MHANHMAD, S. et al. Seasonal effects on bunch components and fatty acid composition in Dura oil palm (*Elaeis guineensis*). **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 7, p. 835-1843, 2011.

MOURA, Roberto Cardoso de et al. Fruit and seed biometry of *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae), in the natural vegetation of the North of Minas Gerais, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, p. 415-419, 2010.

MOURA, Sueli da Silva Santos et al. Caracterização biométrica de frutos, diásporos e sementes de *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. **Diversitas Journal**, v. 4, n. 3, p. 701-716, 2019.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, B. C. et al. Importancia agroecológica del coyul (*Acrocomia mexicana* Karw. ex Mart.). **Estudios sociales** (Hermosillo, Son.), v. 21, n. 41, p. 95-113, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

RENCORET, Jorge et al. Variability in lignin composition and structure in cell walls of different parts of Macaúba (Acrocomia aculeata) palm fruit. Journal of agricultural and food chemistry, v. 66, n. 1, p. 138-153, 2018.

ROSA, T.L.M.; ARAUJO, C.P.D.; ALEXANDRE, R.S. et al. Biometry and genetic diversity of paradise nut genotypes (Lecythidaceae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.54, n.1, p.1-9, 2019.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J; CHUBA, C.A.M. Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 1023-1028, 2011.

SILVA, M. S.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Biometria dos frutos e divergência genética em uma população de *Geonoma schottiana* Mart. Revista Brasileira de Biociências, v. 5, p. 582-584, 2007

VIANNA, S. A. et al. Biometric characterization of fruits and morphoanatomy of the mesocarp of *Acrocomia* species (Arecaceae). **International Journal of Biology**, v. 9, n. 3, p. 78-92, 2017.

CAPÍTULO 4

DRESS: SÍNDROME DA HIPERSENSIBILIDADE A DROGAS COM EOSINOFILIA E SINTOMAS SISTÊMICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 05/02/2021

Italo Felipe Cury
Universidade de Gurupi (UNIRG)
Gurupi - Tocantins
http://lattes.cnpq.br/1418933830266129

Eduarda Pereira Ceroni
Universidade de Gurupi (UNIRG)
Gurupi - Tocantins
http://lattes.cnpq.br/4162263119141041

Julia Libanori Fragoso
Universidade de Gurupi (UNIRG)
Gurupi - Tocantins
http://lattes.cnpq.br/4909593862243420

Leticia Nunes Montes
Universidade de Gurupi (UNIRG)
Gurupi - Tocantins
http://lattes.cnpq.br/2405922299761651

Louise Volpini Lustosa
Universidade de Gurupi (UNIRG)
Gurupi - Tocantins
http://lattes.cnpq.br/2054600342112406

Maria Clara Amaral de Arruda Falcão Ferro
Universidade de Gurupi (UNIRG)
Gurupi - Tocantins
http://lattes.cnpq.br/5921794058474928

Samara Tatielle Monteiro Gomes
Departamento de Ciências Básicas em Saúde
Da Universidade de Gurupi (UNIRG)
Gurupi - Tocantins
http://lattes.cnpq.br/8030341754247257

RESUMO: A síndrome da hipersensibilidade a drogas com eosinofilia e sintomas sistêmicos é uma síndrome rara, multissistêmica e potencialmente fatal. A predisposição a tal Hipersensibilidade está associada a fatores genéticos, uma vez que o polimorfismo no gene que codifica as moléculas de antígenos leucocitários humanos (HLA) permitem a apresentação de uma ampla gama de ligantes peptídicos. O objetivo deste trabalho é demonstrar a relação entre o consumo de certos fármacos com os sintomas apresentados por um indivíduo com DRESS assim como compreender possíveis complicações, tratamentos e critérios de diagnóstico, além de fomentar o diagnóstico precoce. Trata-se de uma revisão sistemática de literatura a partir da extração dos dados em indexadores como Google Acadêmico, SciELO, PUBMED, MEDLINE, tendo como descritores: DRESS, reações a drogas, hipersensibilidade, exantema, medicamentos. Os estudos trazem evidências que a DRESS está associada a diversos fatores genéticos e imunológicos, portanto possuem múltiplas manifestações clínicas. Tal fato reforça a importância da interdisciplinaridade para o tratamento e acompanhamento de pacientes que desenvolvem a DRESS. Conclui-se que há a necessidade de mais estudos científicos randomizados uma vez que, atualmente, há a prevalência de estudos de baixa e média confiança científica.

PALAVRAS - CHAVE: DRESS; Reações a drogas; Hipersensibilidade; Exantema; Medicamentos.

DRESS: DRUG HYPERSENSITIVITY SYNDROME WITH EOSINOPHILIA AND SYSTEMIC SYMPTOMS: A SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT: The hypersensitivity syndrome to drugs with eosinophilia and systemic symptoms is a rare, multisystemic and potentially fatal syndrome. The predisposition to hypersensitivity is associated with genetic factors, the polymorphism in the gene that encodes the molecules of human leukocyte antigens (HLA) allows the presentation of a wide range of peptide ligands. (because the gene that encodes the molecules of human leukocyte antigens (HLA) allows the presentation of a wide range of peptide ligands, calls polymorphism.) The objective of this article is to demonstrate the relationship between consumption of certain drugs and symptoms presented by the patients with DRESS, as well as to understand possible complications, treatments and diagnostic criteria, in addition to promoting early diagnosis. This is a systematic review of the literature based on the extraction of databases as Google Scholar, SciELO, PUBMED, MEDLINE, having as descriptors: DRESS, drug reactions, hypersensitivity, rash, medications. The studies provide evidence that the DRESS is associated with several genetic and immunological factors, therefore, it has multiple clinical manifestations. This fact reinforces the importance of interdisciplinarity for the treatment and monitoring of patients who develop DRESS. It is concluded there is need for more randomized scientific studies since, currently, there is a prevalence of low and medium scientific confidence studies.
KEYWORDS: DRESS; Drug reactions; Hypersensitivity; Rash; Medicines.

1 | INTRODUÇÃO

A síndrome da hipersensibilidade a drogas com eosinofilia e sintomas sistêmicos (DRESS) é rara, multissistêmica e potencialmente fatal, que pode afetar a pele, e também outros órgãos como fígado, rins e coração, desencadeada principalmente pelo uso de fármacos como antiepilépticos aromáticos, aluprinol, sulfonamidas e outras variantes de antibióticos. Tem capacidade de causar febre, vermelhidão, linfadenopatia e anormalidades hematológicas. Contudo, devido aos crescentes números de casos associados a psicotrópicos, está ganhando espaço dentro dos estudos interdisciplinares com a psiquiatria, imunologia e genética.

O objetivo desta revisão literária é demonstrar de forma sistemática a relação entre o consumo de certos medicamentos com os sintomas apresentados por um indivíduo com DRESS e assim compreender os sintomas, assim como complicações, tratamentos e critérios de diagnóstico, além de fomentar o diagnóstico precoce.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão sistemática de literatura a partir da extração dos dados em indexadores como Google Acadêmico, SciELO, PUBMED, MEDLINE, de publicações entre 2008 a 2019, nos idiomas português, inglês e espanhol, tendo como descritores: DRESS, reações a drogas, hipersensibilidade, exantema, medicamentos.

Após a seleção, baseando-se nos critérios de inclusão, foram contabilizados 24 artigos, dentre eles estudos de casos clínicos e revisões literárias. Como critérios de exclusão foi adotado que não deveriam ser trabalhos de dissertação, monografias e teses.

Este estudo não foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos, por que se trata de uma revisão sistemática com informações obtidas em fontes secundárias e já publicadas, não havendo, portanto, riscos iminentes aos sujeitos referidos no presente estudo.

3 I DESENVOLVIMENTO

Os trabalhos encontrados limitam-se principalmente a estudos de caso e há, atualmente, uma carência de estudos científicos mais aprofundados acerca do tema.

Os trabalhos mostram que a predisposição a DRESS está associada a fatores genéticos, como o polimorfismo nos genes do CYP, da Glutathione-S-transferase, da N-acetiltransferase e nos genes que codificam o HLA.

A relação da DRESS com os polimorfismos em HLA está no aumento da capacidade na apresentação de uma ampla gama de ligantes peptídicos, o que resulta em uma maximização da vigilância imunológica, sendo responsável também pelas diferenças na metabolização da droga, gerando diferenças nos metabólitos intermediários. Essa predisposição genética determinada por variantes dos genes do HLA é demonstrado em artigos recentes através de experimentos que mostram a interação com medicamentos das classes de anticonvulsivantes aromáticos, antidepressivos, sulfonamidas e sulfonas, drogas anti- inflamatórias, inibidores da enzima de conversão da angiotensina e betabloqueadores.

As variantes clínicas da síndrome podem indicar o envolvimento de diversos fatores genéticos e imunológicos com alterações cutâneas, onde apresenta critérios de Registro de Adversidade Cutânea Severa da Europa (RegiSCAR) a sistêmica, incluindo possíveis complicações cardíacas. Somado a isso, o manejo do paciente inclui tratamento com anti-histamínicos, emolientes, corticoesteróides e plasmaferese, além da imediata suspensão da medicação que causou a hipersensibilidade

4 I CONCLUSÃO

Com o estudo foi possível observar uma prevalência de estudos de relatos de casos clínicos em contraponto à escassez de estudos científicos mais aprofundados e atuais acerca de reações medicamentosas que relacionam farmacodermias e alterações sistêmicas.

Dessa forma, devido a importância clínica e epidemiológica da síndrome, que apesar de rara tem alta mortalidade devido às inúmeras complicações possíveis, há uma necessidade de fomentar a conscientização do diagnóstico precoce de DRESS.

REFERÊNCIAS

BOMMERSBACH, Tanner J. et al. **Management of Psychotropic Drug–Induced DRESS Syndrome: A Systematic Review.** In: Mayo Clinic Proceedings. Elsevier, 2016. p. 787-801.

ILLING, Patricia T.; PURCELL, Anthony W.; MCCLUSKEY, James. **The role of HLA genes in pharmacogenomics: unravelling HLA associated adverse drug reactions.** Immunogenetics, v. 69, n. 8-9, p. 617-630, 2017.

JAMES, Jared et al. **Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome secondary to furosemide: case report and review of literature.** The American Journal of Case Reports, v. 19, p. 163, 2018.

KANO, Yoko; SHIOHARA, Tetsuo. **The variable clinical picture of drug-induced hypersensitivity syndrome/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms in relation to the eliciting drug.** Immunology and allergy clinics of North America, v. 29, n. 3, p. 481-501, 2009

MATTA, Juan Manuel Ruiz; FLORES, Silvia Méndez; CHERIT, Judith Domínguez. **Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) and its relation with autoimmunity in a reference center in Mexico.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 92, n. 1, p. 30-33, 2017.

CAPÍTULO 5

ELABORAÇÃO DE MANUAL PRÁTICO COMO INSTRUMENTO PARA ENSINO EM LABORATÓRIOS ACADÊMICOS DE RADIOLOGIA ODONTOLÓGICA

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 05/01/2021

Johnatan Luís Tavares Góes
Universidade Federal do Pará, Faculdade de Odontologia Belém – Pará
http://lattes.cnpq.br/2832479037374616

Pedro Luiz de Carvalho
Universidade Federal do Pará, Faculdade de Odontologia Belém – Pará
http://lattes.cnpq.br/5038567496330588

RESUMO: O controle dos processos é fundamental para garantir a segurança dos procedimentos realizados em laboratórios acadêmicos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi elaborar um manual de aulas práticas para laboratórios acadêmicos de radiologia odontológica. A metodologia utilizada é de natureza descritiva e documental. A proposta do manual foi constituída a partir de adaptações de manuais já existentes. A validação do manual ocorreu em três etapas: pesquisa documental, aplicação dos exercícios práticos e avaliação da metodologia de ensino. Conclui-se que com esse manual seja possível melhorar as condições de ensino de radiologia odontológica, além do uso e a organização dos laboratórios acadêmicos.

PALAVRAS - CHAVE: Ensino, Laboratórios, Manual de Laboratório, Radiologia.

PREPARATION OF DENTAL RADIOGRAPHY LABORATORY MANUAL

ABSTRACT: Process control is essential to ensure the safety of procedures performed in academic laboratories. The objective of this work was to develop a dental radiology laboratory manual. The methodology used is of a descriptive and documentary nature. The proposal for the manual was based on adaptations of existing manuals. The manual was validated in three stages: documentary research, application of practical exercises and evaluation of the teaching methodology. It is concluded that with this manual it is possible to improve the teaching conditions of dental radiology, in addition to the use and organization of academic laboratories.

KEYWORDS: Teaching, Laboratories, Laboratory Manual, Radiology.

INTRODUÇÃO

Em certo momento, algumas pessoas possuem a oportunidade de escolher um curso de graduação, que o formará para ser um profissionalcompetente em sua área de atuação. De acordo com Santos, Ferreira e Batista (2016). Na área da saúde é importante que o profissional tenha uma formação da qual desenvolva responsabilidade profissional, conscientização individual e coletiva, que já começam a ser adquiridas durante a graduação, pois o mesmo estará lidando com outras vidas, vidas que estão sujeitas a sua competência profissional.

Como formador desse tipo de profissional a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará tem em seu Projeto Político Pedagógico a disciplina de Propedêutica Odontológica I, cujo ensino é voltado para área do diagnóstico, onde alguns dos temas abordados são nas áreas de Estomatologia e Radiologia Odontológica e Imaginologia. Esta disciplina, alia o ensino teórico e prático, o teórico em salas de aulas ou em meio do ambiente virtual deaprendizagem. Já o ensino prático acontece na clínica odontológica e Laboratório de Ensino de Radiologia Odontológica. Com o tempo, esse laboratório foi provido com equipamentos e materiaispara melhor atender os discentes, preparando-os melhor e mais treinados para o mercado de trabalho.

O Laboratório de Ensino de Radiologia Odontológica é destinado ao ensino, pesquisa e extensão, e permite facilitar a aprendizagem prática dos discentes. Nesse laboratório existe equipamentos radiológicos de um alto custo, o que por consequência, dificulta o processo de aquisição dos mesmos. Os equipamentos foram adquiridos por meio de processo licitatório, onde as aquisições são complexas e necessitam de assistência no momento de montagem e instalação, o que pode gerar custos. A utilização incorreta destes pode provocar prejuízos financeiros altos, podendo impedir nova aquisição e/ou necessitando de manutenção corretiva.

O manual de ensino prático para uso no laboratório acadêmico de radiologia odontológica visa facilitar a utilização consciente desses laboratórios, de forma a otimizar e compartilhar espaços e equipamentos. Além disso, a inexistência de um texto para práticas de Radiologia Odontológica adaptado às nossas condições de laboratório, e destinado aos cursos de Odontologia, nos motivaram a elaboração deste manual. No presente trabalho foi elaborado um manual de boas práticas para o uso dos ambientes do Laboratório de Ensino deRadiologia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará, já que o mesmo não possuía qualquer tipo de documento de normatização para a sua utilização.

REVISÃO DA LITERATURA

Para o desenvolvimento desse trabalho foram necessários conhecimentos prévio sobre o assunto do tema a ser tratado e com isso, iniciou-se a pesquisa. Foram utilizados alguns conhecimentos para dar fundamentaçãoteórica.

O ENSINO COMO FONTE DE CONHECIMENTO

A educação formal é a abordagem de ensino mais conhecida pelas instituições públicas e privadas, seja ela de ensino básico, superior, especial, profissional e de jovens e adultos (REIS; SEMÊDO; GOMES, 2012). É aquela onde a uma hierarquização, há um docente e os discentes. A aula adotada normalmente é expositiva e o docente fala e os

discentes ouvem. Desta forma o discente aprende o que lhe foi “ensinado”.

No entanto o ensino tem passado por diversas modificações ao longo dos últimos anos, principalmente com relação aos seus objetivos. Atualmente não só as aulas expositivas têm passado por essas modificações, mas também outras formas de abordagem aos discentes foram desenvolvidas denominadas de metodologias ativas de aprendizagem.

ENSINO TEÓRICO

A educação formal possui órgãos fiscalizadores como o Ministério da Educação, é utilizada por escolas e universidades, existem hierarquia docente-discente. Para Gohn (2006), essa relação de ensino aprendizagem tem caráter metódico e, usualmente, divide-se por idade/classe de conhecimento.

Segundo Moura et al. (2010), o ensino teórico normalmente é generalizado para todos os discentes, todos eles são ensinados da mesma forma onde o docente fala e os discentes ouvem, as tarefas de estudo, ações de estudo, ações de autoavaliação e regulação estão integrados, o docente é responsável por mediar esses componentes e permitir que o discente aprenda conceitos de forma sistemática e intencional, fazendo com que seu desenvolvimento seja embasado em pensamento teórico.

Sabe-se que o ensino teórico é de extrema importância para o conhecimento, onde a sala de aula é um lugar que possibilita significações e as construções conceituais, os discentes e docentes podem fazer perguntas de suas dúvidas, trazendo formas de buscas de conhecimento (MACHADO, 2012).

ENSINO PRÁTICO

Tanto o ensino prático quanto o teórico são importantes na formação do discente. A formação prática é aquela que se “ensaia” o que será realizado no mercado de trabalho, trazendo maior segurança para o discente. Nos laboratórios de aulas práticas os discentes ficam sob supervisão e auxílio do docente da disciplina, tendo esse ambiente para colocar o conhecimento teórico em prática, isso “é uma forma otimizada de aproximação da academia e campo de atuação, fazendo que se entenda no processo de formação o que é esperado no futuro profissional” (FREITAS; MADUREIRA; MAESTRI, 2014). Os conhecimentos adquiridos no laboratório contribuem para que o discente agregue valores além de conhecimento acadêmico.

A monitoria também é uma forma de ensino prático, pois um discente pratica o transmitir seu conhecimento e experiência para outros discentes. Outra forma de ensino prático é o estágio, pois nele o discente enfrenta o “mundo real” e o que irá encontrar no futuro profissional (SANTOS; FERREIRA; BATISTA, 2016).

LABORATÓRIOS ACADÊMICOS

Os laboratórios acadêmicos são ambientes onde os discentes possuem aulas práticas em determinada área. As aulas ministradas em laboratórios acadêmicos são complementares às aulas teóricas (FONSECA *et al.*, 2013), dão suporte para que o discente desenvolva conhecimento prévio do que irá encontrar no mercado de trabalho.

Uma pesquisa feita com os estudantes do Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, mostrou que "a falta ou a dificuldade de relacionar a teoria e a prática pode levar ao empobrecimento da formação do discente para o mundo do trabalho" (SOUZA; LOBATO, 2012). Afinal, é o ambiente que o discente pode treinar o que lhe foi ensinado, sem medo de errar, para que futuramente, no ambiente profissional esteja mais encorajado e preparado.

PROTEÇÃO RADIOLÓGICA

A radiação ionizante pode ser natural (radionuclídeos e radiação cósmica) ou artificial (reator nuclear, aceleradores de partícula ou tubos de raios X), essa radiação pode trazer para o corpo humano consequências (OKUNO, 2013). Tem-se a preocupação com seus efeitos que podem ser determinísticos e/ou estocásticos. O efeito determinístico é "ocasionado por altas doses de radiação num curto espaço de tempo, e o efeito estocástico, provocado por pequenas doses recebidas ao longo de um grande período" (SOARES; PEREIRA; FLÔR, 2011), dentre esses efeitos estão relacionados catarata, radiodermite, esterilidade temporária e permanente, etc (FENYO-PEREIRA, 2019).

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 330, de 20 de dezembro de 2019 é responsável pelo regulamento da proteção radiológica em serviços de radiodiagnóstico médico e odontológico no Brasil. Esse regulamento não estabelece normas específicas para centros de ensino e laboratórios acadêmicos, pois pelo princípio de justificação, nenhum exame deverá ser realizado sem prescrição médica ou a título de experimentação.

Os laboratórios acadêmicos servem para que se treinem os posicionamentos e técnicas sem exposições desnecessárias. Porém, essa Resolução determina como os ambientes de radiodiagnóstico devem ser sinalizados e formas de evitar acidentes, sendo que alguns dos aparelhos dos laboratórios acadêmicos possuem tubo de raios X. Então faz-se importante o conhecimento da portaria para evitar acidentes desnecessários e tratar o ambiente de estudo como um local mais próximo do futuro ambiente profissional.

METODOLOGIA

O estudo trata de um trabalho descritivo e documental, e para elaborar este manual realizou-se a análise dos manuais já existentes e levantou-se informações relevantes para fazer adaptação em um manual para uso em laboratórios acadêmicos de Radiologia.

O desenvolvimento do trabalho ocorreu no Laboratório de Ensino de Radiologia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará.

O trabalho consistiu em três etapas, sendo: a) pesquisa documental; b) aplicação dos exercícios; e c) leitura dos relatórios de respostas produzidos pelos estudantes.

Na primeira etapa teve caráter documental, que consistiu na descrição de exercícios práticos, com base em normas e/ou instruções de segurança em relação aos riscos, boas práticas em Radiologia, utilizadas no Laboratório de Ensino de Radiologia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (FO-UFPA).

A segunda etapa foi realizada a aplicação dos exercícios nas aulas práticas, na disciplina de Propedêutica Odontológica I da FO-UFPA. Cada exercício, precedido de seu objetivo e/ou finalidade fundamental, foi dividido em seis partes, a saber:

- Introdução – Descrição resumida da teoria, do tema ou utilizada no exercício.
- Material necessário – Relação do material utilizado durante o exercício.
- Procedimentos – Passo a passo para a realização do exercício.
- Questões baseadas no exercício de laboratório – Onde se apresentam algumas perguntas destinadas a aprofundar, melhorar o espírito crítico e discutir os conhecimentos dos fenômenos estudados.
- Objetivos da aula – Resultado esperado após a realização do exercício.
- Questões de revisão – Onde se apresentam algumas perguntas relacionadas ao exercício ou assunto. As respostas encontram-se no final do livro.

A terceira etapa consistiu na leitura e discussão dos relatórios produzidos pelos estudantes após a realização do exercício diário.

RESULTADOS

O resultado foi a confecção de um manual prático digital como instrumento para ensino em laboratórios acadêmicos de Radiologia Odontológica, o download do manual pode ser obtido no link: https://linktr.ee/lerofoufpa ou no endereço: https://drive.google.com/file/d/1urVm_wiCuQZbPxNleKv_DEfks65LzRPt/view?usp=sharing

A composição do manual gerou 6 capítulos com exercícios práticos e questões de revisão, além de questões para auto-estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inexistência de um texto para práticas de Radiologia Odontológica adaptado às nossas condições de laboratório, e destinado aos cursos de Odontologia, nos motivaram a elaboração deste manual. Os exercícios foram selecionados de modo a englobar alguns

assuntos fundamentais de Radiologia Odontológica, que podem ser facilmente efetuados em clínicas de ensino de Radiologia com recursos limitados ou não.

O conhecimento referente foi evidenciado, tendo em vista orientar o uso correto dos laboratórios acadêmicos de Radiologia. Espera-se que com esse manual possa vir projetos futuros dando continuidade ao mesmo, acrescentando novos materiais e equipamentos que possam ser adquiridos posteriormente, sugestão de boas práticas que não foram mencionadas ou revisando-os futuramente para o que ambiente sempre possua um documento atualizado.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o manual melhore o uso e a organização dos laboratórios acadêmicos de Radiologia Odontológica e minimize possíveis acidentes.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 330, de 20 de dezembro de 2019**. Diario Oficial da União n. 249, de 26 de dezembro de 2019.

FENYO-PEREIRA, M. **Fundamentos de odontologia: radiologia odontológica e imaginologia.** 2.ed. [reimpr.] Rio de Janeiro: Santos, 2019. 386p.

FONSECA, M *et al*. **O laboratório virtual: Uma atividade baseada em experimentos para o ensino de mecânica.** Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 35, n. 4, 4503, 2013.

FREITAS, T. L. L.; MADUREIRA, V. S. F.; MAESTRI, E. **Relato de Experiência Acerca do Ensino Teórico-Prático em Atenção Básica de Saúde**. Revista de Enfermagem, v. 10, n. 10, p. 47-53, 2014.

GOHN, M. G. **Educação não-formal, participação da sociedade civil e estruturas colegiadas nas escolas.** Revista Ensaio-Avaliação e Políticas Públicas em Educação, v. 14, n. 50, p. 11-25, 2006.

MACHADO, V. F.; SASSERON, L. H. **As perguntas em aulas investigativas de ciências: a construção teórica de categorias.** Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências, v. 12, n. 2, p. 29-44, 2012.

MOURA, Manoel et al. **Atividade orientadora de ensino: unidade entre ensino e aprendizagem.** Revista Diálogo Educacional, v. 10, n. 29, 2010. p. 205-229, jan./abr. 2010.

OKUNO, E. **Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia.** Estudos avançados, v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013.

REIS, L. C. L.; SEMÊDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C. **Conscientização ambiental: da educação formal a não formal.** Revista Fluminense de Extensão Universitária, v. 2, n. 1, p. 47-60, 2012.

SANTOS, D. M.; FERREIRA, B. J.; BATISTA, N. A. **A formação para a prática do tecnólogo em radiologia**. INOVAE-Journal of Engineering and Technology Innovation, v.4, n. 1, p. 23-32, 2017.

SOARES, F. A. P.; PEREIRA, A. G.; FLÔR, R. C. **Utilização de vestimentas de proteção radiológica para redução de dose absorvida: uma revisão integrativa da literatura.** Radiol Bras, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2011.

SOUZA, C. B. O.; LOBATO, J. F. P. **A Relação Teoria e Prática no Ensino Superior.** 2012. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/63034/Ensino2012_Resumo_25947.pdf?sequence=1>. Acesso em: 13 fev. 2021.

CAPÍTULO 6

EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES TECIDOS DA ESPÉCIE LEGUMINOSA FORRAGEIRA *Stylosanthes capitata VOGEL*

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 08/12/2020

Fernando Bonifácio-Anacleto
Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/0043916542934916

Carolina Costa Silva
Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/8821002356857308

Priscila Marlys Sá Rivas
Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/4080101034174287

Carlos Alberto Martinez
Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/3370953480222387

Ana Lilia Alzate-Marin
Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/5557045699055496

RESUMO: O uso de marcadores moleculares em plantas requer DNA de boa qualidade e integridade, porém raramente se obtém o melhor material para sua extração. Neste estudo foi avaliada a eficiência da extração de DNA de quatro diferentes tecidos da espécie *Stylosanthes capitata* Vogel. O material utilizado foi: folhas cotiledonares frescas (FCtF); folhas frescas de plantas adultas congeladas (-20 ºC) (FFC); folhas secas de plantas adultas armazenadas a temperatura ambiente (11 meses) (FS) e inflorescências secas armazenadas a temperatura ambiente (7 meses) (IS). Para a extração do DNA foi utilizado um protocolo rápido de CTAB. Os DNAs das amostras foram quantificados seguindo as razões 260/280nm (~1,8) e 260/230nm (2,0-2,2) para verificar contaminação por proteínas e carboidratos, respectivamente. As amostras também foram submetidas a eletroforese em gel de agarose para verificar sua integridade e amplificadas com o marcador microssatélite SC 18-01 A2A, desenvolvido para a espécie. Como resultado observou-se que a concentração de DNA de FS e FCtF foram semelhantes (FS=288,39±27,11; FCtF=261,2±29,18) e maiores em comparação com as outras amostras ($p<0,01$). Os materiais de maior pureza foram observados em FCtF (260/280=1,90; 260/230=1,73 $p<0,01$), seguido por FS e FFC com resultados semelhantes para 260/280 (FS=1,78; FFC=1,89 $p<0,05$) e para 260/230 (FS=1,22; FFC=1,27). O DNA concentrado dos tecidos FCtF e FFC mostraram maior integridade seguido por FS, enquanto o IS não foi visualizado. Todas as amostras de FCtF, FFC e 44% de FS amplificaram com o marcador SSR, enquanto que para IS não foi observado produto de amplificação. Em todos os parâmetros,

o DNA de IS obteve os menores valores (p<0,01) mostrando contaminação por carboidratos (260/230=0,28±0,06), possível consequência da alta concentração desses fotoassimilados nas inflorescências da planta no momento da coleta. Em resumo, excetuando IS, os DNAs de diferentes fontes de tecidos vegetais foram adequados para amplificação e análise de marcadores moleculares da espécie.
PALAVRAS - CHAVE: Extração DNA; Tecidos vegetais; Pureza e integridade; Stylosanthes sp.

DNA EXTRACTION IN DIFFERENT PLANT TISSUES OF THE LEGUMINOUS FORAGE SPECIES *Stylosanthes capitata VOGEL*

ABSTRACT: The use of molecular markers in plants requires DNA of good quality and integrity; however the best material for their extraction is rarely obtained. In this study the efficiency of the DNA extraction of four different tissues of the species *Stylosanthes capitata* Vogel was evaluated. The material used was: fresh cotiledonous leaves (FCtF); fresh leaves of frozen adult plants (-20ºC) (FFC); dry leaves of adult plants stored at room temperature (11 months) (FS) and dry inflorescences stored at room temperature (7 months) (IS). For the extraction of DNA a fast protocol of CTAB was used. The DNAs of the samples were quantified following the ratios 260/280nm(~1.8) and 260/230nm(2.0-2.2) to verify contamination by proteins and carbohydrates, respectively. The samples were also submitted to agarose gel electrophoresis to verify their integrity and amplified with the microsatellite marker SC18-01A2A, developed for the species. As a result it was observed that the DNA concentration of FS and FCtF were similar (FS=288.39±27.11; FCtF=261.2±29.18) and higher in comparison with the other samples (p<0.01). The highest purity materials were observed in FCtF (260/280=1.90; 260/230=1.73 p<0.01), followed by FS and FFC with similar results for 260/280 (FS=1.78; FFC=1.89 p<0.05) and for 260/230 (FS=1.22; FFC=1.27). The concentrated DNA from the FCtF and FFC tissues showed greater integrity followed by FS, while the IS was not visualized. All samples of FCtF, FFC and 44% of FS amplified with the SSR marker, whereas for IS, no amplification product was observed. In all parameters. In all parameters, the IS DNA obtained the lowest values (p<0.01) showing carbohydrate contamination (260/230=0.28±0.06), possible consequence of the high concentration of these photoassimilates in the inflorescences of the plant at the time of collection. In summary, except for IS, the DNAs of different plant tissue were suitable for amplification and analysis of molecular markers of the species.
KEYWORDS: DNA extraction; Plant tissues; Purity and integrity; *Stylosanthes.*

1 I INTRODUÇÃO

O DNA genômico encontra-se associado a diversas proteínas e enzimas, que agem na arquitetura da molécula, no seu processo de replicação, na manutenção da sua integridade e em outros processos afins (Lewin, 2009). Quando se tem o propósito de utilizar este DNA em estudos que fazem o uso de marcadores moleculares, há a necessidade de que o material tenha uma boa qualidade, quantidade e integridade (Romano et al., 1998). No entanto raramente é possível obter o melhor material para a utilização destas estratégias, pelas próprias características do material e porque a sua obtenção pode estar restrita a

determinado estágio de maturação do indivíduo.

Nas células vegetais os polissacarídeos e fenóis são compostos secundários que se apresentam com maior abundancia (Lien et al., 1999; Wang et al., 2020). No processo de extração de ácidos nucleicos com alta pureza e qualidade, tais compostos se tornam um obstáculo (Romano et al., 1998). A pureza e qualidade do DNA extraído podem ser verificadas com os métodos de absorbância (densidade óptica) e análise de eletroforese em gel de agarose.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da extração de DNA de quatro tecidos diferentes da espécie leguminosa forrageira *Stylosanthes capitata* Vogel: Folhas cotiledonares frescas, folhas frescas de plantas adultas congeladas, folhas e inflorescências dessecadas de plantas adultas armazenadas em temperatura ambiente.

2 I METODOLOGIA

2.1 A espécie em estudo

Stylosanthes capitata Vogel é um subarbusto perene de 50-120 cm de altura com estrutura foliar composta por três folíolos (Figura 1A), com inflorescências formadas por brácteas modificadas em espigas terminais e flores pediceladas de corola amarela (Figura 1B). Esta espécie, nativa do Brasil (regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste) com domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, apresenta melhor adaptação em solos areno-argilosos ou argilo-pedregosos em ambientes úmidos (Costa et al., 2008; Fortuna-Perez et al., 2011; Costa et al., 2014).

Figura 1. Estruturas foliares elípticas trifolioladas, inflorescências e flores de corola amarela, dispostas em brácteas da espécie S. capitata. (Fotos: Laboratório Genética Vegetal, USP/RP)

2.2 Origem do material vegetal

Os tecidos de *S. capitata* utilizados neste trabalho foram provenientes de coletas da variedade "Estilosantes Campo Grande" no experimento Trop-T-Face (*Temperature Free Air Controlled Enhancement and Free Air Carbon Dioxide Enrichment*) instalado na Universidade de São Paulo *campus* de Ribeirão Preto, SP (Figura 2A-D). As sementes da espécie, cultivadas no campo experimental, foram gentilmente cedidas pela Embrapa Gado de Corte.

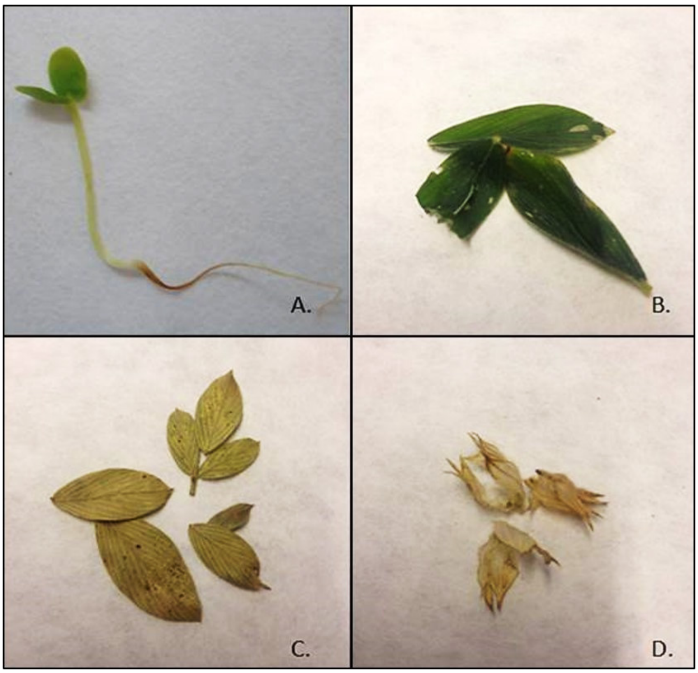


Figura 2. Tecidos vegetais da espécie *S. capitata.* A: folhas cotiledonares frescas (FCtF); B: folhas frescas congeladas (FFC); C: folhas secas (FS) e D: inflorescências secas (IS).

Uma descrição mais detalhada do sistema Trop-T-Face encontra-se disponível em Martinez et al. (2014) e Habermann et al. (2019).

2.3 Tipos de tecidos

Amostras de folhas adultas foram coletadas e congeladas a -20 °C, sendo denominadas como FFC (folhas frescas congeladas – Figura 2B). Plantas adultas com folhas e inflorescências foram dessecadas em estufa e conservadas em sacos de papel a temperatura ambiente por um período de 11 meses. No sétimo mês foram coletadas as brácteas das plantas secas, denominadas como IS (inflorescências secas – Figura 2D), e no mês 11 foram coletadas as folhas secas, denominadas como FS (folhas secas – Figura

2C). No laboratório, sementes da espécie foram germinadas *in vitro* (sob fotoperíodo de 12 horas, com temperatura média de 25,2±1,1 ºC e umidade relativa de 47,3±5,0%) e após cinco dias, os tecidos das plântulas foram coletados e denominados como FCtF (folhas cotiledonares frescas – Figura 2A).

2.4 Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 150mg dos quatro diferentes tecidos vegetais, por meio do método descrito por Alzate-Marin et al. (2009). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop 2000c) medindo-se a absorbância, nos comprimentos de onda 260/280 e 260/230 nm.

2.5 Validação por amplificação com marcador molecular

Para validar as extrações de DNA nos diferentes tecidos vegetais, foi utilizado o marcador microssatélite (SSR), desenvolvido para a espécie em estudo, SC 18-01 A2A (*forward*: 5'AGCAGCATAGGGAATAAAT3' e reverse: 5'CAAAGGCCTAATCAACTGTG 3') (Santos-Garcia et al., 2011; Alzate-Marin et al., 2020).

As reações em cadeia de polimerase (PCR), foram realizadas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf), nas seguintes condições: 2*µ*l de DNA genômico, em um volume total de 5*µ*l de GoTaq Colorless Master Mix, 5 *µ*l de Nuclease-Free Water (Promega) (Taq DNA polymerase fornecida em tampão de reação [pH 8.5] 2x incolor, 400*µ*l, dATP, 400*µ*l dGTP, 400*µ*l dCTP, 400*µ*l dTTP e 3mM MgCl2) e 1 *µ*l do marcador SSR. As amplificações foram conduzidas de acordo com a programação de 1 ciclo a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 1 ciclo a 72 °C por 7 minutos. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e marcados com SYBER™ Green (Thermo Fisher Scientific) e visualizados em fotodocumentador (ImageQuant LAS500 – GE).

2.6 Analises estatísticas

Os efeitos da influência da origem da amostra foram analisados utilizando ANOVA *one-way*, e a diferença entre os tratamentos foi analisada utilizando o teste de Tukey 5%, com o auxílio de ferramentas de análise do Excel e do *software* estatístico PAST 4.03 (Hammer et al., 2001).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação de DNA e relações de pureza

O material genômico extraído dos quatro diferentes tipos de tecidos foi quantificado, verificando-se a pureza de acordo com as medidas de absorbância 260/280 e 260/230 nm, sendo esperados resultados de aproximadamente 1,8 e 2,0-2,2 respectivamente para cada razão. Estas razões estão vinculadas às verificações de contaminação por proteínas

e carboidratos, respectivamente, quando menores que os valores de referência (NanoDrop Spectrophotometers).

3.2 Concentração de DNA

Houve um efeito significativo da origem das amostras na concentração de DNA obtido na extração ao nível de 5% [F(3;40)=29,95; p=2,551E-10]. Comparações posteriores usando o teste de Tukey HSD indicaram que as concentrações médias em ng/uL dos DNAs extraídos das FS e das FCtF foram similares (FS=288,39±27,11; FCtF=261,2±29,18) e mais alto que os obtidos em outros tecidos (p<0,01) (Tabela 1). A concentração média de DNA foi mais alta em folhas frescas congeladas a -20 ºC (FFC=117,9±16,11) que nas brácteas das inflorescências dessecadas (IS=39,9±3,55), no entanto não se observaram diferenças significativas entre as médias, de acordo com Tukey (p<0,05).

	FFC[1]	**FCtF**[2]	**IS**[3]	**FS**[4]
Média	117,90	261,21	39,99	288,39
EP[5]	16,11	29,18	3,55	27,11

[1]Folhas adultas frescas congeladas em -20 °C; [2]Folhas cotiledonares frescas; [3]inflorescências secas; [4]folhas adultas dessecadas em temperatura ambiente; [5]Erro padrão da média.

Tabela 1. Concentrações médias de DNA em ng/μL de quatro tipos de tecidos vegetais de onze plantas da espécie S. capitata

3.3 Relações de pureza de DNA

Foi observado um efeito significante ao nível de p<0,05 da origem das amostras com relação à pureza do DNA extraído, medido nas razões de absorbância 260/280 [F(3;40)=34,85; p=3,0377E-11]. Comparações posteriores usando o teste de Tukey HSD indicaram que as relações médias de 260/280 dos DNAs extraídos das FFC, FCtF e FS foram similares (FFC=1,89±0,02; FCtF=1,90±0,01; FS=1,78±0,05) e mais altas (p<0,01) que as obtidas de IS (IS= 1,44±0,07) (Tabela 2, Figura 3). Em geral os valores observados para FFC, FCtF e FS estão próximos a 1,8, valor este usado como referência de pureza da razão 260/280. O valor de 1,44 indica contaminação por proteínas nas amostras de IS analisadas (Figura 3).

	FFC[1]		FCtF[2]		IS[3]		FS[4]	
	260/280	*260/230*	*260/280*	*260/230*	*260/280*	*260/230*	*260/280*	*260/230*
Média	1,89	1,27	1,90	1,73	1,44	0,28	1,78	1,22
EP[5]	0,02	0,10	0,01	0,07	0,06	0,02	0,05	0,06

[1]Folhas adultas frescas congeladas em -20 °C; [2]Folhas cotiledonares frescas; [3]inflorescências secas; [4]folhas adultas dessecadas em temperatura ambiente; [5]Erro padrão da média.

Tabela 2. Relações médias de 260/280 e 260/230 nm obtidas em Nanodrop de quatro tipos de tecidos vegetais de onze plantas da espécie S. capitata

Também foi observado um efeito significativo ao nível de $p<0,05$ da origem das amostras com relação à pureza do DNA extraído, medido nas razões 260/230 [$F(3;40)=81,22$; $p=4,62E-17$]. Comparações posteriores usando o teste de Tukey indicaram que as médias da razão 260/230 de FCtF foram mais altas (FCtF=1,73±0,07; $p<0,01$) que as obtidas das outras amostras (Tabela 2; Figura 3). As médias da razão 260/230 de FFC e FS foram similares (FFC=1,27±0,10; FS=1,22±0,06) e mais altas que as observadas nas inflorescências secas (IS= 0,28±0,06), que por sua vez foram significativamente mais baixos ($p<0,01$) que nos outros dois tecidos analisados. Em geral, todas as amostras apresentaram valores abaixo do esperado para serem consideradas livres de contaminantes, como carboidratos, mais especialmente os tecidos IS são os que apresentam maior grau de impurezas (Figura 3). Os DNAs dos tecidos que estão mais próximas da razão de referência (260/230=2,0) são originários de folhas cotiledonares frescas (FCtF).

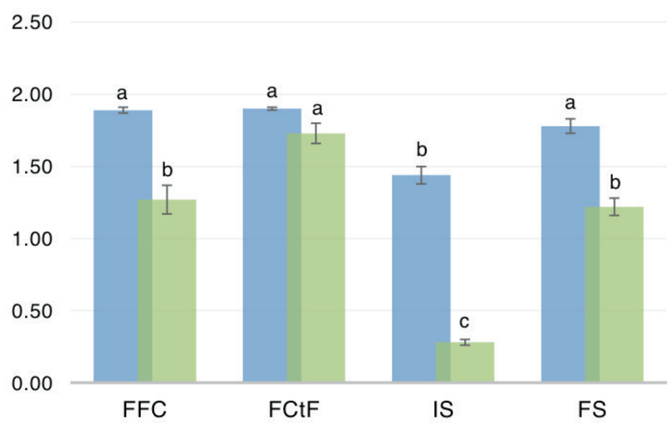


Figura 3. Relações de pureza de acordo com as absorbâncias 260/280 (barras azuis) e 260/230 (barras verdes) do conjunto de quatro tipos de tecidos vegetais da espécie S. capitata, sendo FFC – folhas frescas congeladas; FCtF – folhas cotiledonares frescas; IS – inflorescências secas; FS – folhas secas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).

Em todos os parâmetros de pureza avaliados, os DNAs extraídos das inflorescências secas (IS) obtiveram as menores médias (260/280=1,44; 260/230=0,28) (Figura 3), mostrando contaminação com proteínas e elevado grau de contaminação por carboidratos, o que pode ser consequência da alta concentração de fotoassimiliados neste órgão específico da planta, considerados como drenos, e também em função do horário em que a coleta deste material foi realizada. Os materiais de maior pureza, visando ambos os parâmetros analisados, foram os oriundos dos tecidos FCtF (260/280=1,90; 260/230=1,73), seguidos de FS e FFC, que foram similares nos parâmetros avaliados.

3.4 Integridade do DNA e validação por amplificação

Os tecidos de FFC e FCtF apresentaram ótima qualidade nas análises eletroforéticas, apresentando bandas compactas sem arrastre (Figuras 4A e 4B).

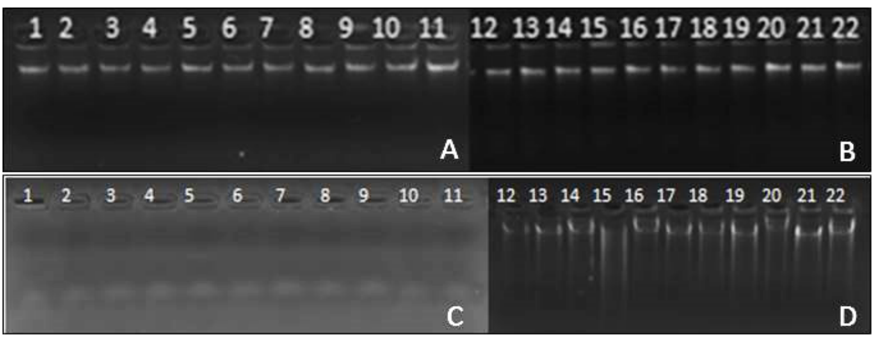


Figura 5. Gel agarose 1% para validação da qualidade e integridade do DNA de tecidos vegetais de S. capitata. Sendo: A) canaletas superiores 1-11: DNA de folhas frescas congeladas (FFC) e conservadas em -20 ºC; B) canaletas superiores 12-22: DNA das folhas cotiledonares frescas (FCtF); C) canaletas inferiores 1-11: DNA de inflorescências secas (IS) e D) Canaletas 12-22: DNA das folhas secas (FS).

O DNA das inflorescências secas (Figura 4C) não apresentou um padrão eletroforético visível, o que mostra uma baixa concentração de DNA, como já observado na quantificação (Tabela 1), além das contaminações detectadas nas análises de pureza (Figura 3). O DNA das amostras das folhas secas mostrou uma integridade menor (Figura 4D), observando-se degradação do material extraído, embora com qualidade suficiente para amplificação.

Na amplificação via PCR (SSR SC 18-01 A2A), todas as amostras dos tecidos cotiledonares frescos (FCtF) e folhas adultas frescas conservadas a -20 ºC (FFC) apresentaram produtos de amplificação (Figuras 5a,b), porém os DNAs das amostras de FS só apresentaram produtos de amplificação ótimo para 4 (45,45%) das onze amostras analisadas (Figura 5c). Inicialmente não foi observado produto de amplificação no DNA extraído de inflorescências dessecadas.

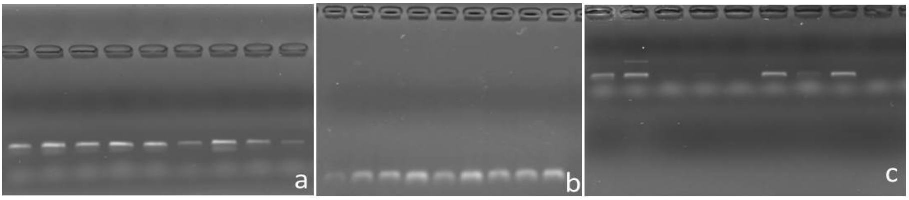


Figura 6. Produtos de amplificação com o marcador SSR SC 18-01 A2A dos tecidos vegetais de folhas cotiledonares (FCtF – a), folhas frescas congeladas (FFC – b) e folhas secas (FS – c) da espécie S. capitata, em gel de agarose 1%.

4 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, nossos resultados sugerem que a origem das amostras tem um real efeito sobre a concentração, pureza e qualidade do DNA extraído da espécie *S. capitata*. Os melhores tecidos para extração de DNA desta espécie foram os obtidos das folhas cotiledonares frescas e das folhas adultas frescas congeladas à -20 ºC, as quais apresentaram altas concentrações, boas relações de pureza além da integridade e consequente amplificação via PCR, visualizados em gel de agarose. Também foi observado o sucesso de extração de DNA das folhas secas conservadas em temperatura ambiente abrindo a possibilidade de análises genéticas com este tipo de tecido. Embora fosse observada menor qualidade e graus de contaminação com carboidratos, as FS também apresentaram altas concentrações e boas razões para 260/280, além dos produtos de amplificação visualizados em 44% das amostras analisadas. Já as inflorescências secas se mostram como possíveis tecidos para extração de DNA, quando não há disponibilidade de outros, para uso molecular, no entanto serão necessários maiores ajustes na coleta, armazenamento e extração deste material.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Projeto Temático da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 08/58075-8) para C.A.M. e pelo projeto de Pesquisa FAPESP (Processo 15/23930-9) para A.L.A.M. A.L.A.M também foi apoiada por uma bolsa de Pós-Doutorado Sênior do CNPq (Processo 150737/2014-9). C.A.M. teve apoio do CNPq/ANA/MCTI (Processo 446357/2015-4) e bolsa PQ do CNPq (Processo 306039/2016-8). F.B.A. foi apoiado por FAPESP/bolsa TTIII (Processo 2013/18633-0) e por CNPq/bolsa DSc (Processo 141921/2019-6). C.C.S. foi apoiada por FAPESP/bolsa IC e TTIII (Processos 2014/24817-9 e 2016/21182-8, respectivamente). P.M.S.R. foi apoiada por bolsa DSc CNPq (140144/2016-1).

REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA-SILVA, C.; RIVAS, P.M.S.; BONIFACIO-ANACLETO, F.; SANTOS, L.G.; MORAES FILHO, R.M.D.; MARTINEZ, C.A. (2020). **Diagnostic fingerprints ISSR/SSR for tropical leguminous species *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala***. Scientia Agricola, 77(3).

ALZATE-MARIN, A.L.; GUIDUGLI, M.C.; SORIANI, H.H.; MARTINEZ, C.A.; MESTRINER, M.A. (2009). **An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species.** Brazilian Archives of Biology and Technology, 52(5):1217-1224.

COSTA, L.C.D.; SARTORI, Â.L.B.; POTT, A. (2008). **Estudo taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil**. Rodriguésia, 59(3):547-572.

COSTA, L.D.; VALLS, J. (2014). **Stylosanthes in Lista de Espécies da Flora do Brasi**l. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil. jbrj. gov. br/jabot/floradobrasil/FB29882>

FORTUNA-PEREZ, A.P.; SILVA, M.J.; TOZZI, M.G.A. (2011) ***Stylosanthes* (Leguminosae – Papilionoideae–Dalbergiae) no estado de São Paulo, Brasil**. Rodriguésia, 62(3):615-628.

HABERMANN, E.; SAN MARTIN, J.A.B.; CONTIN, D.R.; BOSSAN, V.P.; BARBOZA, A.; BRAGA, M.R.; GROPPO, M.; MARTINEZ, C.A. (2019) **Increasing atmospheric CO2 and canopy temperature induces anatomical and physiological changes in leaves of the C4 forage species *Panicum maximum***. PLoS ONE, 14(2):e0212506.

HAMMER, O.; HARPER, DAT.; RYAN, P.D. (2001) **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis**. Palaeontologia Electronica, 4(1):9pp.

LEWIN, B. (2009) **Genes IX**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed.

LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H.H.; WANG, R. (1999). **Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants**. Free Radical Biology and Medicine, 26(3-4):285-294.

MARTINEZ, C.A.; BIANCONI, M.; SILVA, L.; APPROBATO, A.; LEMOS, M.; SANTOS, L.; CURTARELLI, L.; RODRIGUES, A.; MELLO, T.; MANCHON, F. (2014) **Moderate warming increases PSII performance, antioxidant scavenging systems and biomass production in *Stylosanthes capitata* Vogel.** Environmental and Experimental Botany, 102:58-67.

NANODROP SPECTROPHOTOMETERS. **Assessment of Nucleic Acid Purity**. Technical Bulletin T042. Thermo Fisher Scientific – NanoDrop Products. http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (1998) **Extração de DNA de tecidos vegetais. Manual de transformação genética de plantas**. Embrapa, SPI/Embrapa, Cenargen. Brasilia, p. 171.

SANTOS-GARCIA, M.O.; RESENDE, R.M.S.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. (2011) **Mating systems in tropical forages: Stylosanthes capitata Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.** Euphytica, 178(2):185–193.

WANG, Z.; LI, S.; GE, S.; LIN, S. (2020). **Review of Distribution, Extraction Methods, and Health Benefits of Bound Phenolics in Food Plants**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(11):3330-3343.

CAPÍTULO 7

INTRODUÇÃO DE BANCO DE GERMOPLASMA DE PITAYA NO IFES CAMPUS ITAPINA

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 08/12/2020

Luis Carlos Loose Coelho
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo – Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/0320554247565248

Pamela Vieira Coelho
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo - Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/5382378587298650

Roberto Kirmse
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo - Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/1838845686905902

João Pedro Silva de Abreu
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo - Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/4837612787665590

Jhonathan Elias
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo - Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/1483759826874154

Hércules dos Santos Pereira
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo - Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/3545351456720530

Carolina Maria Palácios de Souza
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo - Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/4753345751383655

Jadier de Oliveira Cunha Junior
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo - Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/2291040775973639

Ana Paula Cândido Gabriel Berilli
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo – Campus Alegre
Alegre-ES
http://lattes.cnpq.br/8154953381311097

Ronilda Lana Aguiar
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Espírito Santo - Campus Itapina
Colatina-ES
http://lattes.cnpq.br/9777424713746600

RESUMO: A conservação dos recursos genéticos das espécies vegetais, bem como a aquisição de uma maior variabilidade genética, visando um possível programa de melhoramento, pode ser feita através de um banco ativo de germoplasma. No município de Colatina-ES, onde se localiza o IFES campus Itapina, a cultura da pitaya ainda é pouco explorada, o objetivo do trabalho foi introduzir acessos de pitaya, tradicionais ou locais, produzidas pela agricultura familiar na Região Noroeste do Espírito Santo. Os cladódios de pitaya foram adquiridos de pequenos plantios no município de Marilândia-ES, sendo obtidas

as espécies, *Hylocereus undatus* (frutos de casca vermelha e polpa branca) e *Hylocereus costaricensis* (frutos de casca e polpa vermelhas). O plantio foi feito no setor de Culturas Perenes do IFES, com 3 linhas e 20 plantas por linha, sendo 30 plantas de cada espécie. Foi acompanhada a altura das plantas, aos 30, 45 e 60 dias após o plantio em campo, fazendo-se uma comparação interespecífica do crescimento inicial. A avaliação estatística foi em DIC, com 10 repetições compostas por 3 plantas cada, para cada uma das espécies. Foi realizada a análise de variância a 1%, não sendo necessário o teste de médias, visto que foram somente duas espécies (tratamentos). A espécie *H. costaricensis* obteve as seguintes médias de altura da planta respectivamente aos 30, 45 e 60 dias após o plantio (60,98cm; 68,87cm; 77,1cm), sendo bem superiores as médias de *H. undatus*, que foram (31,97cm; 35,67cm; 43,53cm).
PALAVRAS-CHAVE: *Hylocereus*; Conservação; Variabilidade.

INTRODUCTION OF PITAYA GERMOPLASM BANK IN THE IFES CAMPUS ITAPINA

ABSTRACT: The conservation of genetic resources of plant species, as well as the acquisition of greater genetic variability, aiming at a possible breeding program, can be done through an active germplasm bank. In the municipality of Colatina-ES, where the IFES campus Itapina is located, the culture of pitaya is still little explored, the objective of the work was to introduce pitaya accesses, traditional or local, produced by family farming in the Northwest Region of Espírito Santo. Pitaya cladodes were acquired from small plantations in the municipality of Marilândia-ES, obtaining the species, *Hylocereus undatus* (Fruits with red skin and white pulp) and *Hylocereus costaricensis* (Fruits with red skin and pulp.). Planting was done in the IFES Perennial Cultures sector, with 3 rows and 20 plants per row, 30 plants of each species. The height of the plants was monitored at 30, 45 and 60 days after planting in the field, making an interspecific comparison of the initial growth. The statistical evaluation was in DIC, with 10 replicates composed of 3 plants each, for each species. Analysis of variance at 1% was carried out, without the need for averages testing, since there were only two species (treatments). The species *H. costaricensis* obtained the following plant height averages, respectively, at 30, 45 and 60 days after planting (60.98cm; 68.87cm; 77.1cm), being much higher than *H undatus*, which were (31.97cm; 35.67cm; 43.53cm).
KEYWORDS: *Hylocereus*; Conservation; Variability.

INTRODUÇÃO

A pitaya tem origem na América e distribuição em países como Costa Rica, Venezuela, Panamá, Uruguai, Brasil, Colômbia e México (CANTO, 1993). Existem diferentes tipos de pitaya, que podem ser separadas em quatro gêneros: Stenocereus, Cereus, Selenicereus e Hylocereus, as mais comuns são a pitaya amarela (*Selenicereus megalanthus*) com casca amarela e polpa branca, e a pitaya vermelha (*Hylocereus sp.*), tem casca vermelha e polpa branca ou vermelha, dependendo da espécie (GIAROLA, 2012). As diferentes espécies podem ser encontradas em locais com distintas condições ambientais, desde regiões com baixa altitude e clima quente e úmido, até clima frio com maior altitude, o que mostra

grande capacidade de adaptação (SILVA, 2014).

A pitaya é considerada como trepadeira, pertence à família das cactáceas, é uma fruta exótica que tem se destacado no mercado de fruticultura brasileiro (SANTOS et al., 2010). Pode ser consumida in natura, como suco, sorvete, mousse, e até para produção de corantes. Além disso possui alguns valores medicinais, pelo fato de ter captina, que é reconhecido como um tônico cardíaco. Seu óleo tem efeito laxante, sendo efetivo no controle da gastrite e infecções nos rins (DONADIO, 2009).

No brasil principalmente na região de Catanduva São Paulo existem pequenas áreas de plantio de pitaya. No entanto a crescente tendência do consumo de frutas exóticas e seu preço tem despertado interesse nos produtores, que começam a apostar nessa cultura. Na região Sudeste a produção ocorre durante os meses de dezembro e maio, com produtividade anual de 14 toneladas de fruto/ha (BASTOS et al., 2006).

No entanto, não se dispõe de cultivares que possibilitem a formação de pomares comerciais, para tal se faz necessário a obtenção de acessos que contenham boas características. A conservação dos recursos genéticos das espécies vegetais, bem como a aquisição de uma maior variabilidade genética, visando um possível programa de melhoramento, pode ser feita através de um banco ativo de germoplasma (COSTA et al., 2011). No município de Colatina-ES, onde se localiza o IFES campus Itapina, a cultura da pitaya ainda é pouco explorada, o objetivo do trabalho foi introduzir um banco de germoplasma no campus, com acessos de pitaya, tradicionais ou locais, produzidas pela agricultura familiar na Região Noroeste do Espírito Santo.

MATERIAIS E MÉTODO

Os cladódios de pitaya foram adquiridos de pequenos plantios no município de Marilândia-ES, sendo obtidas as espécies, (*Hylocereus undatus* Haw.) (frutos de casca vermelha e polpa branca) e (*Hylocereus costaricensis* Web.) (frutos de casca e polpa vermelhas). Foram cortadas estacas de 20 cm, colocadas em calda bordalesa por 1 minuto, em seguida foram transferidas para uma caixa de areia para enraizamento. Aos 60 dias as mudas foram plantadas em campo. O plantio foi feito no setor de Culturas Perenes do IFES, com 3 linhas e 20 plantas por linha, sendo 30 plantas de cada espécie. As plantas foram adubadas com composto orgânico contendo esterco de caprino e capim seco, curtidos, cerca de 500 g por planta. Não se mostrou necessário nenhum tipo de controle de pragas ou doenças. As plantas foram tutoradas e amarradas com barbante, deixando-se apenas dois brotos no máximo por planta para formação da parte produtiva. Foram realizadas duas roçadas e uma capina manual no período de implantação. A irrigação foi por gotejamento e realizada diariamente, exceto em períodos de precipitação intensa. Foi acompanhada a altura das plantas, aos 30, 45 e 60 dias após o plantio em campo, fazendo-se uma comparação interespecífica do crescimento inicial. A avaliação estatística foi em DIC, com

10 repetições compostas por 3 plantas cada, para cada uma das espécies. Foi realizada a análise de variância a 1%, não sendo necessário o teste de médias, visto que foram somente duas espécies (tratamentos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As duas espécies demonstraram um bom desenvolvimento inicial em campo, porém, a *H. costaricensis* (polpa vermelha) obteve médias de altura muito superiores a *H. undatus* (polpa branca) (Tabela 1). Esta primeira apresentou altura (90%, 93% e 77%) maior que a outra, respectivamente aos 30, 45 e 60 dias.

Espécie	Altura da planta (cm)		
	30 dias	45 dias	60 dias
H. costaricensis (Polpa vermelha)	60,98 a	68,87 a	77,1 a
H. undatus (Polpa branca)	31,97 b	35,67 b	43,53 b

Tabela 1- Médias da altura das plantas de *H. costaricensis* e *H. undatus* aos 30, 45 e 60 dias após o plantio.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem entre si, pela análise de variância a 1% de probabilidade.

É provável que a pitaya de polpa vermelha apresente maior crescimento devido a melhor adaptação as condições ambientais do local, ou por características específicas da espécie.

A introdução do banco de germoplasma foi um passo importante para a conservação da variabilidade genética de pitaya, além de possibilitar a caracterização dos acessos e o início de um futuro programa de melhoramento genético, visando a obtenção de matrizes com boas características para a região noroeste do Espírito Santo.

CONCLUSÃO

Através da introdução dos acessos no campus foi possível se obter uma pequena coleção de plantas, visando a conservação das espécies e futuros programas de melhoramento e seleção.

REFERÊNCIAS

BASTOS, Débora Costa et al. **Propagação da pitaya vermelha por estaquia**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, Mg, v. 30, p.1106-1109, 6 jul. 2006. Bimestral.

CANTO, A. Rodríguez et al. El cultivo de pitahya en Yucatan. Universidad Autonoma Chapingo; Gobierno del Estado de Yucatan, 1993.

COSTA, Tatiana Santos et al. **Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 46, n. 5, p. 499-507, 2011.

DONADIO, Luiz Carlos. **Pitaya**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, Sp, v. 31, p.637-929, 2009.

GIAROLA, Júlia de Fátima Emilioreli. **Cultivo da pitaia: Implantação**. Lavras, Mg: Ufln, 2012. 16 p.

SANTOS, Caio Márcio Guimarães et al. **Substratos e regulador vegetal no enraizamento de estacas de pitaya**. Revista Ciência Agronômica, v. 41, n. 4, p. 625-629, 2010.

SILVA, Adriana de Castro Correia da. **Pitaya: Melhoramento e produção de mudas**. 2014.

CAPÍTULO 8

MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE ALTA PUREZA A PARTIR DE FOLHAS DA ESPÉCIE *Stylosanthes capitata* (VOGEL)

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 08/12/2020

Fernando Bonifácio-Anacleto
Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/0043916542934916

Priscila Marlys Sá Rivas
Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/4080101034174287

Tathyana Rachel Palo Mello
Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/9374434116114880

Carlos Alberto Martinez
Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/3370953480222387

Ana Lilia Alzate-Marin
Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
Ribeirão Preto – São Paulo
http://lattes.cnpq.br/5557045699055496

RESUMO: As espécies de *Stylosanthes* spp. apresentam elevados níveis de polissacarídeos em suas folhas que podem potencialmente interferir e dificultar a extração de ácidos nucleicos de boa qualidade, em especial para o isolamento de RNA. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi comparar dois protocolos de isolamento de RNA (Trizol+acetato de sódio [TA] e Trizol+sarcosil+acetato de sódio [TSA]) a partir de tecidos foliares da espécie *Stylosanthes capitata* Vogel coletados em um experimento de campo sobre simulação de mudanças climáticas futuras (Trop-T-Face:*Temperature Free Air Controlled Enhancement and Free Air Carbon Dioxide Enrichment da* USP/RP). No protocolo TA foi adicionado acetato de sódio 3M na fase de purificação de RNA, desde que este sal participa na precipitação dos ácidos nucleicos junto com o Etanol. No protocolo TSA, foi adicionado o detergente sarcosil na solução de extração o qual auxilia na solubilização de proteínas, além da adição do acetato de sódio como previamente relatado. Como resultados foram observadas diferenças altamente significativas ($p<0,01$) para ambas as metodologias de extração em todos os parâmetros estudados. A concentração média de RNA (ng/uL) foi 6,3 vezes superior em TSA (TSA=911,25 vs. TA=145,35). As razões de pureza ao redor de 2,0 e entre 2,0-2,2 para os parâmetros 260/280 e 260/230, respectivamente, foram observados em 96% das amostras do protocolo TSA. Os resultados de integridade do RNA (RIN), o qual é classificado como 1 = RNA degradado a 10 = RNA intacto, confirmam que o protocolo TSA alcançou os melhores resultados devido à melhor qualidade e integridade das

amostras (média de 3,87/TA e 7,25/TSA). Estes parâmetros indicam que para extração do RNA de folhas da espécie S. capitata, o método TSA é o mais indicado, com 84% de eficiência, em comparação ao método TA, que alcançou 25%.
PALAVRAS - CHAVE: RNA; Método de extração; *Stylosanthes.*

HIGH-PURITY RNA EXTRACTION METHOD FROM LEAVES OF THE SPECIES *Stylosanthes capitata* (VOGEL)

ABSTRACT: *Stylosanthes* spp. species have high levels of polysaccharides in their leaves that can potentially interfere and make it difficult to extract good quality nucleic acids, especially for the isolation of RNA. In this context, the objective of this research was to compare two RNA isolation protocols (Trizol+sodium acetate [TA] and Trizol+sarcosyl+sodium acetate [TSA]) from leaf tissues of the species Stylosanthes capitata Vogel collected in a field experiment on simulation of future climate changes (Trop-T-Face: Temperature Free Air Controlled Enhancement and Free Air Carbon Dioxide Enrichment from USP/RP). In the TA protocol 3M sodium acetate was added in the RNA purification phase, since this salt participates in the precipitation of nucleic acids together with Ethanol. In the TSA protocol, sarcosil detergent was added in the extraction solution which helps in protein solubilization, besides the addition of sodium acetate as previously reported. As results, highly significant differences ($p<0.01$) were observed for both extraction methodologies in all parameters studied. The mean RNA concentration (ng/uL) was 6.3 times higher in TSA (TSA=911.25 vs. TA=145.35). Purity ratios around 2.0 and between 2.0-2.2 for parameters 260/280 and 260/230 respectively, were observed in 96% of samples of the TSA protocol. The results of RNA integrity (RIN), which is classified as 1 = RNA degraded to 10 = RNA intact, confirm that the TSA protocol achieved the best results due to the better quality and integrity of the samples (average of 3.87/TA and 7.25/TSA). These parameters indicate that for extraction of RNA from leaves of the S. capitata species, the TSA method is the most indicated, with 84% efficiency, compared to the TA method, which reached 25%.
KEYWORDS: RNA; Extraction methods; *Stylosanthes.*

1 | INTRODUÇÃO

As moléculas de RNA não são somente intermediárias entre as informações genéticas contidas no DNA e a proteína. Pesquisas recentes vêm elucidando uma gama de possibilidades oriundas das modificações pós-transcricionais nas moléculas de RNA, o que aumenta a complexidade dos produtos transcritos de um mesmo gene. Evidencia-se assim a importância do RNA na determinação de fenótipos (Li e Mason, 2014).

A extração de ácidos ribonucleicos (RNA) do interior de células eucarióticas pode ser realizada para diversas finalidades, desde estudos de expressão gênica, análise funcional dos RNAs, da qualidade dos transcritos, análise da expressão gênica, dentre outras. A maior dificuldade na extração de RNA envolve a alta incidência de ribonucleases (enzimas que se mantêm ativas mesmo na ausência de cofatores), que são capazes de degradar rapidamente as riboses da molécula do RNA. A presença do grupamento

hidroxila no carbono 2´ da ribose torna a molécula de RNA mais suscetível a hidrólise pelas ribonucleases (Yockteng et al., 2013). Por isso, os protocolos de extração de RNA devem contar com etapas que visem: 1) A inativação destas enzimas endógenas nas amostras (ex: congelamento das amostras ou tratamento químico) e, 2) A redução da contaminação das amostras por ribonucleases exógenas (ex: utilizando materiais e reagentes autoclavados, limpeza e cuidado com a manipulação das amostras).

As novas tecnologias automatizadas de análise do RNA (como o *RNA sequencing*) são de grande importância para análise de milhões de transcritos de uma determinada população. Entretanto, elas requerem altas concentrações de RNA, com alta qualidade e pureza para sua utilização. Em especial, o isolamento de RNA de plantas para essa finalidade vem sendo um verdadeiro desafio, pois as células vegetais produzem alta quantidade de polissacarídeos (como taninos), polímeros orgânicos (como a lignina) e metabólitos secundários (como terpenos e flavonoides). Estas moléculas complexas são de difícil remoção, o que impossibilita a obtenção de uma RNA de alta qualidade e pureza (Jordon-Thaden et al., 2015).

Em vista disso, inúmeros métodos de extração foram testados e publicados para os mais diversos táxons vegetais (Johnson et al., 2012; Yockteng et al., 2013; Jordon-Thaden et al., 2015). Entretanto, sua grande variabilidade dificulta a escolha de um método padrão. Jordon-Thaden e colaboradores (2015) analisaram diversos métodos empregados para extração de RNA de diferentes táxons vegetais, observando que aqueles que continham Trizol e o reagente sarcosil foram os de maior eficiência.

Como relatado por Chiari et al. (2009), as folhas das plantas das espécies de *Stylosanthes* spp., inclusive as jovens, apresentam elevados níveis de polissacarídeos em suas folhas, os quais podem potencialmente dificultar o isolamento de ácidos nucleicos de alta qualidade, o que representa um desafio (Bonato et al., 2002; Faleiro et al., 2003; Chiari et al., 2009), especialmente em se tratando da extração de RNA. Trabalhos prévios relatam a extração de RNA de *Stylosanthes guianensis* Aubl. usando o reagente Trizol (Sun et al., 2013; Liu et al., 2016).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi comparar a eficiência de dois protocolos: Trizol + acetato de sódio (TA) e Trizol + sarcosil + acetato de sódio (TSA) no isolamento de RNA a partir de tecidos foliares da espécie *Stylosanthes capitata* coletados em um experimento de campo sobre a simulação de mudanças climáticas futuras em sistema Trop-T-Face.

2 | METODOLOGIA

2.1 Coleta de amostras foliares de *Stylosanthes capitata*

As amostras de folhas de *Stylosanthes capitata* Vogel, para o estudo foram coletadas de um experimento em campo aberto, denominado Trop-T-Face, que teve por objetivo determinar os efeitos da elevada temperatura (+2 °C) e elevado CO_2 (600 ppm) (Figura 1). Uma descrição mais detalhada deste sistema de simulação Trop-T-Face encontra-se disponível em Martinez et al. (2014) e Haberman et al. (2019). As amostras de folhas coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O material foi mantido em -80 °C até o momento da sua utilização para extração do RNA. Foram extraídas 12 amostras em cada protocolo.

Figura 1. Flores de Stylosanthes capitata em campo experimental. (Foto: Laboratório de Genética Vegetal, USP-RP)

2.2 Protocolos de extração do RNA

O RNA total de folhas foi extraído seguindo o protocolo do Trizol de acordo com o manual do fabricante (Thermo Fisher Scientific) com pequenas modificações especialmente em tempos de centrifugação e períodos de incubação. No protocolo 1, denominado TA, foi adicionado acetato de sódio 3M na fase de purificação de RNA, desde que este sal (CH_3COONa) diminui a solubilidade em água dos ácidos nucleicos sendo, portanto, comumente usada em precipitações de DNA e RNA com etanol (Maniatis et al.,1982).

No protocolo 2, denominado TSA, além do acetato de sódio foi adicionado o sal sarcosil ($C_{15}H_{30}NNaO_4$) que atua como detergente na solubilização de proteínas e já foi relatado com sucesso no processo de extração de DNA e RNA em plantas (Cheung et al., 1993; Jordon-Thaden et al, 2015).

2.2.1 Protocolo TA – Trizol + acetato de sódio

Aproximadamente 250mg de folhas foram dispostas em tubos de 2mL estéreis e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos foram macerados com pistilos estéreis, acoplados em parafusadeira portátil, até obtenção de um pó fino. Adicionou-se 1mL de Trizol (Invitrogen), seguido de homogeneização vigorosa em vórtex. O material foi incubado em temperatura ambiente (20-30 ºC) por 2-3 minutos, sendo posteriormente centrifugadas a 4 °C na velocidade de 12.000rpm por 10minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2mL e acrescido de 200μL de clorofórmio. A mistura foi agitada por inversão (15-20 segundos) e incubada novamente à temperatura ambiente (20-30 °C) por 3 minutos. Submetendo-as em uma nova centrifugação à 4 °C, 12.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL. Adicionou-se 500μL de isopropanol e após agitação, o material foi incubado para precipitação por 10 minutos à -20 °C. Após a precipitação do RNA, as amostras foram centrifugadas, nas mesmas condições anteriores, por 10 minutos. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 75%. Após agitação, as amostras foram centrifugadas novamente e o *pellet* foi ressuspendido em 400μL de água ultrapura tratada com o reagente dietilpirocarbonato (DEPC).

Após a primeira ressuspensão do *pellet* de RNA em água, iniciou-se a etapa de separação, que consistiu em adicionar 400μL de clorofórmio. Após agitação em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 4 °C na velocidade de 12.000rpm, por 10 minutos. O sobrenadante (cerca de 300μL) foi transferido para um novo tubo e cerca de 900μL de etanol 100% gelado foi misturado a cada amostra. Adicionou-se 30μL de acetato de sódio 3M (Ambion) por amostra e incubou-se por 2 horas a -20 °C (Meng e Feldman, 2010).

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 4 °C na velocidade de 12.000rpm, por 30 minutos, retirando o sobrenadante em seguida e o *pellet* de RNA foi lavado com 1mL de etanol 75%. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* submetido ao processo de secagem por 10 minutos, o excesso de gotículas de etanol dentro do tubo foi retirado com o auxílio de ponteiras *RNAse free*. O RNA foi ressuspenso em 30μL de água ultrapura DEPC.

2.2.2 Protocolo TSA – Trizol + Sarcosil + acetato de sódio

O mesmo protocolo anterior foi realizado, com as seguintes modificações: 1) Adicionou-se 50μL de sarcosil 20% junto ao 1mL do reagente de extração Trizol (Invitrogen), na etapa inicial da extração (Huang et al., 2012; Jordon-Thaden et al., 2015). 2) O tempo de incubação com clorofórmio foi aumentado de 3 para 5 minutos. 3) A velocidade das centrifugações foi aumentada de 12.000 para 14.000 rpm. 4) Nas etapas de precipitação do *pellet* (após incubação com isopropanol e após a última lavagem com etanol 75%) o

tempo de centrifugação foi aumentado de 10 para 20 minutos. 5) O período de incubação das amostras com isopropanol foi de 60 minutos à -20 °C. 6) Todos os reagentes utilizados estavam gelados (com exceção da água DEPC).

2.2.3 Tratamento com DNAse

Utilizou-se o kit Turbo DNA-free (Ambion), que consiste na adição de 3μL do tampão DNAse Buffer 10x e de 1μL da enzima DNAse I em 30μL de cada amostra. Os reagentes foram incubados por 25 minutos a 37 °C. Adicionou-se a seguir 1μL do reagente de inativação com incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. Por último, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 1,5 minutos e o sobrenadante (cerca de 30μL) foram transferidos para um novo tubo *RNA-se free.*

2.2.4 Quantificação e qualidade pelo bioanalyser

A concentração de RNA (ng/uL), assim como as razões 260/280 e 260/230 foram mensuradas em NanoDrop 2000c, utilizando 1μL da amostra final. A quantificação e a qualidade e integridade do RNA extraído foram mensuradas por eletroforese capilar realizada no Bioanalisador Agilent, utilizando o Agilent RNA6000 Nano Kit (Aligent Technologies). O programa gerou gráficos com picos de eletroferograma e calculou a integridade do RNA (RIN - *RNA Integrity Number*).

2.3 Análise dos resultados

Foram consideradas amostras de qualidade aquelas que apresentaram: alta concentração de RNA, razão 260/280 no valor de 2,0 e a razão 260/230 no valore entre 2,0-2,2 e o RIN igual ou superior a 7,0. A comparação entre os dois métodos de extração foi realizada por comparação destes parâmetros.

2.4 Análise estatística

Para os dados de cada protocolo que apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk e Lilliefors, $p<0,05$), foram comparados pelo teste *t-Student*, e os que não seguiram normalidade foram comparados com o teste não paramétrico de Mann Whitney. As análises foram conduzidas através dos *softwares* estatísticos Minitab 19 e PAST 4.03.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração do RNA extraído em ng/μL das 12 amostras de *Stylosanthes capitata,* assim como as razões 260/280, 260/230 e o valor de RIN para cada amostra nos diferentes métodos de extração estão dispostos na Tabela 1. A média de concentração de RNA do grupo amostral, extraído pelo método TSA foi estatisticamente superior (t= -5,01;

p<0,001) do que a observada pelas amostras extraídas pelo método TA (TSA=911,25 vs. TA=145,35 ng/uL). A razão 260/230 foi significativamente superior nas amostras extraídas através do método TSA (t= -3,63; p=0,001), e na razão 260/280 observou-se diferenças estatísticas significativas entre as médias do método TA e TSA (p=0,001) segundo o teste de Mann Whitney. O mesmo ocorreu no parâmetro que mede a integridade do RNA (RIN), cujas médias foram TA= 3,88±0,64 e TSA= 7,25±0,22 (p=0,002).

As razões de pureza 260/280 e 260/230 que medem graus de contaminação com proteínas/fenol e fenol/guanidina/etanol/glicerol devem oscilar entre 2,0 e entre 2,0-2,2, respetivamente. Estes valores foram observados em quase 100% das amostras extraídas pelo método com sarcosil, com exceção de duas amostras (1.2, 2.1). Estas amostras, embora apresentem concentração de RNA superior quando extraídas pelo protocolo TSA, apresentam pureza e integridade maior quando extraídas pelo protocolo TA. Uma amostra (4.1) apresentou resultados similares em ambos os métodos.

A Figura 2 mostra o perfil dos picos de eletroforese das amostras corridas pelo método TA (A) e TSA (B). É possível observar que a maioria das amostras extraídas pelo método TA apresentam um pico bastante elevado na altura de 25 nt e menores picos nas alturas de 1000 e 4000 nt (Figura 2A). Já as amostras extraídas pelo método TSA apresentam o padrão oposto: menores picos 25 nt e maiores picos de 1000 e 400 nt (Figura 2B). Isso demonstra claramente como a qualidade e a integridade das amostras extraídas pelo método TSA alcançaram os melhores resultados. Já a Figura 3 apresenta o padrão de bandas eletroforéticas. As bandas mais fortes são observadas nas amostras extraídas pelo método TSA (Figura 3B).

Para determinar a integridade do RNA, os valores de RIN variam de 1 indicando que o material está totalmente degradado e 10 quando o mesmo se encontra completamente intacto (Schroeder et al., 2006). Baseados neste parâmetro pode-se considerar que o método TA alcançou 25% de eficiência e o método TSA alcançou em torno de 83%.

	Método TA: Trizol + Acetato de Sódio				Método TSA: Trizol + sarcosil + Acetato de Sódio			
Amostra	Concentração do RNA (ng/μL)	260/280[1]	260/230[1]	Integridade do RNA (RIN)	Concentração do RNA (ng/μL)	260/280[1]	260/230[1]	Integridade do RNA (RIN)
1.1	92,0	1,93	1,88	2,60	396,0	2,09	2,01	7,40
1.2	73,0	2,03	1,90	7,20	513,0	2,07	2,03	5,70
2.1	64,0	1,96	2,04	7,50	518,0	2,10	2,12	7,20
2.2	63,2	2,02	2,07	4,60	672,0	2,05	2,16	7,30
3.2	137,0	2,01	2,02	2,50	1044,0	2,07	2,12	7,80
4.1	86,0	2,04	1,95	7,50	908,0	2,01	2,03	7,50
4.2	167,0	2,00	2,01	1,90	1985,0	2,03	2,16	7,90
5.1	208,0	1,85	1,89	2,60	1585,0	2,09	2,17	5,70
6.1	170,0	2,03	1,99	2,50	1439,0	2,10	2,16	7,40
6.2	224,0	2,04	1,87	2,60	1000,0	2,04	1,94	7,90
7.1	209,0	2,00	1,99	2,60	306,0	2,03	2,02	7,20
7.2	251,0	2,00	2,03	2,40	569,0	2,03	2,03	8,00
Média	145,35*	1,99	1,97	3,87*	911,25*	2,06	2,08	7,25*
EP[2]	19,74	0,02	0,02	0,64	151,52	0,01	0,02	0,22

[1]Razão de absorbância; [2]Erro padrão da média; (*) diferem estatisticamente ($p<0,01$)

Tabela 1. Comparação da concentração do RNA e das razões entre as absorbâncias obtidas na extração das mesmas amostras utilizando o primeiro e o segundo método.

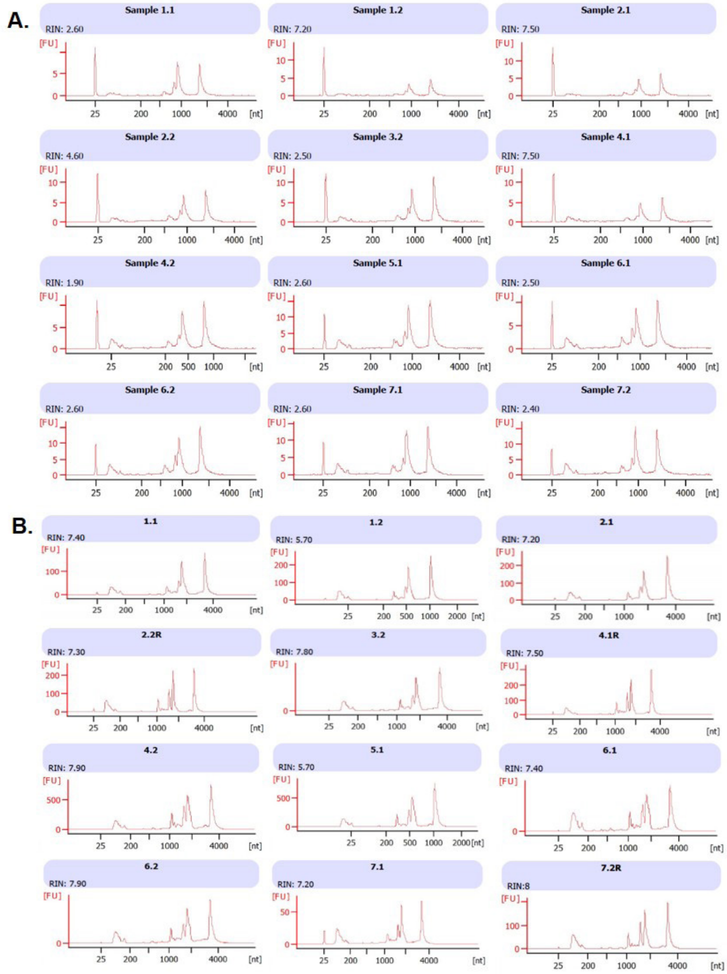


Figura 2. Perfil dos picos de eletroforese capilar obtidas pelo Bioanalyser Agilent RNA 6000 das amostras de RNAs isolados pelas metodologias TA (A) e TSA (B).

As maiores dificuldades com as metodologias estão ligadas a quantidade e qualidade do tecido usado na extração. Folhas amareladas ou muito senescentes foram o fator limitante para obtenção de ótima concentração de RNA, boas razões e valor de RIN acima de 7.0 utilizando o protocolo TSA.

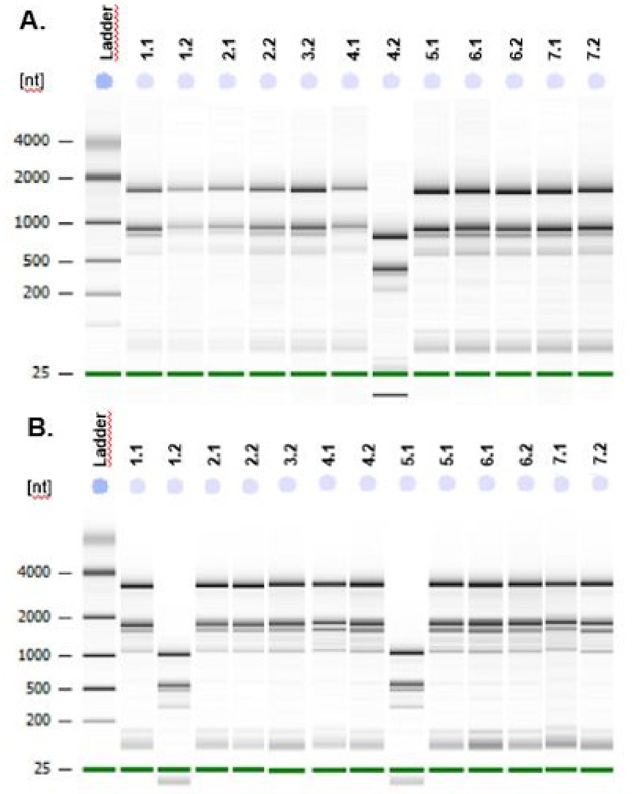


Figura 3. Perfil das bandas de eletroforese capilar obtidas pelo Bioanalyser Agilent RNA 6000 das amostras de RNAs isolados pelas metodologias TA (A) e TSA (B).

Observou-se também que as amostras obtidas dos diferentes tratamentos em campo não parecem interferir na qualidade das amostras, já que houve amostras de igual qualidade em todos os tratamentos.

4 I CONCLUSÃO

Estes resultados nos permitem concluir que o protocolo denominado como TSA, que consiste na adição de sarcosil e de outras modificações (de acordo com o mencionado em material e métodos) do protocolo do Trizol, melhora significativamente a concentração, a qualidade e a integridade do RNA extraído de tecido foliar da espécie *S. capitata*.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Projeto Temático da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 08/58075-8) para C.A.M. e pelo projeto de Pesquisa FAPESP (Processo 15/23930-9) para A.L.A.M. A.L.A.M também foi

apoiada por uma bolsa de Pós-Doutorado Sênior do CNPq (Processo 150737/2014-9). C.A.M. teve apoio do CNPq/ANA/MCTI (Processo 446357/2015-4) e bolsa PQ do CNPq (Processo 306039/2016-8). P.M.S.R. foi apoiada por bolsa DSc CNPq (140144 / 2016-1). F.B.A. foi apoiado por FAPESP/bolsa TTIII (Processo 2013/18633-0) e por CNPq/bolsa DSc (Processo 141921/2019-6). T.R.P.M foi bolsista PD Júnior do CNPq (Processo 500137/2013-7). Agradecemos à Claudia Emília Vieira Wiezel pelo suporte técnico na análise de qualidade do RNA.

REFERÊNCIAS

BONATO A.L.V.; VERZIGNASSI, J.R.; RESENDE, R.M.S.; FERNANDES, C.D.; LEGUIZAMÓN, G.O.D.C. (2002). **Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp.** Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico 78.

CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B.S. (1993**). A simple and rapid DNA micro extraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses.** Genome Research 3:69-70.

CHIARI, L.; DO VALLE, J.V.R.; RESENDE, R.M.S. (2009). **Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*.** Embrapa Gado de Corte. Circular técnica 36.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.; CORDEIRO, M.; KARIA, C. (2014). **Operacionalização da extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando analises moleculares.** Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/567935/1/p200410.pdf

HABERMANN, E.; SAN MARTIN, J.A.B.; CONTIN, D.R.; BOSSAN, V.P.; BARBOZA, A.; BRAGA, M.R.; GROPPO, M.; MARTINEZ, C.A. (2019). **Increasing atmospheric CO_2 and canopy temperature induces anatomical and physiological changes in leaves of the C4 forage species *Panicum maximum***. PLoS ONE 14:e0212506.

HUANG, C.; PICIMBON, Li, H.Q.; Li, Z.; Liu, Q.; Liu, W. (2012). **An efficient method for total RNA extraction from peanut seeds.** Russian Journal of Plant Physiology 59:129-133.

JOHNSON, M.T.J; CARPENTER, E.J.; TIAN, Z. et al. (2012). **Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes.** Plos One. 7(11):e50226.

JORDON-THADEN, I.E.; CHANDERBALI, A.S.; GITZENDANNER, M.A.; SOLTIS, D.E. (2015). **Modified CTAB and TRIzol Protocols Improve RNA Extraction from Chemically Complex Embryophyta.** Applications in Plant Sciences May; 3(5):1400105.

LI, S.; MASON, C.E. (2014). **The pivotal regulatory landscape of RNA modifications.** Annual Review of Genomics and Human Genetics; 15:127-150.

LIU, P. D.; XUE, Y. B.; CHEN, Z. J.; LIU, G. D.; TIAN, J. (2016). **Characterization of purple acid phosphatases involved in extracellular dNTP utilization in *Stylosanthes*.** Journal of Experimental Botany 67:4141-4154.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.T.; SAMBROOK, J.; ENGEL, J. (1982). **Molecular cloning–A laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 545 S.

MARTINEZ, C.A.; BIANCONI, M.; SILVA, L.; APPROBATO, A.; LEMOS, M.; SANTOS, L.; CURTARELLI, L.; RODRIGUES, A.; MELLO, T.; MANCHON, F. (2014). **Moderate warming increases PSII performance, antioxidant scavenging systems and biomass production in *Stylosanthes capitata* Vogel**. Environmental and Experimental Botany 102:58-67.

MENG, L.; FELDMAN, L. (2010). **A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis* siliques and dry seeds.** Biotechnology Journal 5:183-186.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT S.; MENZEL W.; GRANZOW M.; RAGG, T. (2006). **The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.** BMC Molecular Biology 7(1):1-14.

SUN, L.; LIANG, C.; CHEN, Z.; LIU, P.; TIAN, J.; LIU, G.; LIAO, H. (2013). **Superior aluminum (Al) tolerance of *Stylosanthes* is achieved mainly by malate synthesis through an Al-enhanced malic enzyme, SgME1.** New Phytologist 202:209-219.

TRIZOL® **Reagent Procol Thermo-Fisher Scientific**. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

YOCKTENG, R.; ALMEIDA, A.M.R., YEE, Y., ANDRE, T., HILL, C.; SPECHT, C. (2013). **A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analyses.** Applications in Plant Sciences 1(12):1300070.

CAPÍTULO 9

O PAPEL DOS TELÔMEROS NA PROTEÇÃO DO DNA E VIABILIDADE CELULAR

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 28/12/2020

Beatriz Maria Dias Nogueira
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética.
Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/5638783251934431

Caio Bezerra Machado
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética.
Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/9820185993338831

Adrhyann Jullyanne de Sousa Portilho
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética.
Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/8626175751127592

Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética.
Fortaleza – Ceará.
http://lattes.cnpq.br/0043828437326839

Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética.
Fortaleza – Ceará.
http://lattes.cnpq.br/0701679734111287

Maria Elisabete Amaral de Moraes
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética.
Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/3565768281344086

Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes
Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Laboratório de Farmacogenética.
Fortaleza – Ceará
http://lattes.cnpq.br/3191425896154552

RESUMO: As extremidades dos braços dos cromossomos são compostas por uma estrutura de sequências repetidas, denominado telômero. O telômero apresenta como principal função a proteção do DNA. Naturalmente os telômeros se encurtam, mas é um problema quando se trata do encurtamento excessivo em células com alto índice de divisões. Além do telômero se encurtar pelas replicações celulares, o estresse oxidativo ocasionado pelo estilo de vida individual também pode ser um fator de impacto na degradação deles. O alongamento do telômero ocorre principalmente pela enzima telomerase (*hTERT*), considerada uma grande ribonucleoproteína composta por duas principais subunidades: *hTERC* e a denominada *hTERT*. O encurtamento telomérico pode ser revertido com a ação da telomerase, porém, essa enzima se apresenta em quantidades limitadas no corpo humano. Células somáticas normais tem um número limite de divisões estabelecido pelos telômeros, as divisões encurtam os telômeros e

quando atingem o limite de encurtamento, entram em um estado de senescência replicativa. No caso de células em estado anormal, como ocorre nas neoplasias, o gene da telomerase é reativado, gerando o padrão de imortalização celular pela manutenção do comprimento dos telômeros. Outra característica das neoplasias é a instabilidade genética, que pode ser causada pelo encurtamento anormal dos telômeros e pelo acúmulo de mutações em genes de reparo do DNA, o que pode desencadear rearranjos cromossomais e de genes, podendo levar a amplificações de genes alterados e seus produtos. Destacamos nesse capítulo a importância de estudos sobre os telômeros pois seu conhecimento pode auxiliar no diagnóstico e prognósticos de diversas patologias associadas à sua disfunção.
PALAVRAS - CHAVE: Cromossomos; Telômeros; Telomerase.

THE ROLE OF TELOMERES IN DNA PROTECTION AND CELL VIABILITY

ABSTRACT: The ends of the chromosome arms are composed of a structure of repeated sequences, called telomere. The telomere has DNA protection as its main function. Naturally telomeres shorten, but it is a problem when it comes to excessive shortening in cells with high rate of divisions. In addition to the telomere being shortened by cellular replications, oxidative stress caused by the individual lifestyle can also be an impact factor in their degradation. Telomere elongation occurs mainly by the enzyme telomerase (*hTERT*), considered a large ribonucleoprotein composed of two main subunits: *hTERC* and the so-called *hTERT.* Telomere shortening can be reversed with the action of telomerase, but this enzyme is presented in limited amounts in the human body. Normal somatic cells have a limit number of divisions established by telomeres, the divisions shorten the telomeres and when they reach the shortening limit they enter a state of replicative senescence. In the case of dysfunctional cells, as occurs in neoplasms, the telomerase gene is reactivated, generating the pattern of cellular immortalization by maintaining telomere length. Another characteristic of neoplasms is genetic instability, which can be caused by abnormal telomere shortening and the accumulation of mutations in DNA repair genes, which can trigger chromosomal and gene rearrangements, which may lead to amplifications of altered genes and their products. We highlight in this chapter the importance of studies on telomeres because their knowledge can help in the diagnosis and prognoses of various pathologies associated with their dysfunction.
KEYWORDS: Chromosome; Telomere; Telomerase.

FORMAÇÃO E ESTRUTURA DOS CROMOSSOMOS

Presente no núcleo de cada célula, o DNA está compactado em estruturas denominadas cromossomos. Cada cromossomo é formado pela compactação do material genético em componentes proteicos denominados histonas e também por proteínas cromossômicas não histonas. Duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 se encontram unidas e formam um octâmero de histonas, em torno do DNA onde o mesmo se enovela (LENART; KREJCI, 2016).

O octâmero é circundado por duas voltas de DNA dupla hélice no qual constitui a partícula central do nucleossomo. As histonas ligadoras H1 unem os nucleossomos

proporcionando estabilidade para a condensação da cromatina. Por fim, os nucleossomos são empilhados, em formato de alças e são ligados entre si para a organização e estruturação dos cromossomos (**Figura 1**). Embora os nucleossomos sejam compactados, essa estrutura deve ser dinâmica possibilitando sua remodelação para ocorrer tanto o silenciamento genético quanto para permitir o acesso aos genes que precisam ser transcritos (ALBERTS *et al.*, 2017; GRIFFITHS *et al.,* 2016).

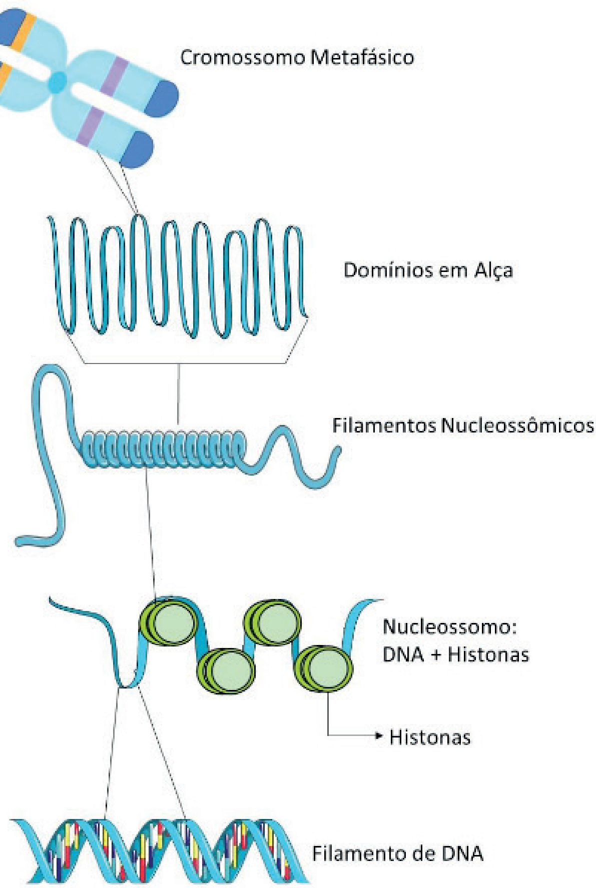


Figura 1. Níveis de organização da cromatina. O cromossomo metafásico presente no núcleo da célula sendo descompactado, formando domínios em alças, que por sua vez são organizados em filamentos nucleossômicos, que representam o menor nível de organização da cromatina, em seguida, apenas a molécula pura de DNA.

Fonte: Autoria Própria (2020).

O DNA é o componente que contém o material hereditário em humanos e diversas espécies biológicas, e quase todas as células do corpo tem a mesma informação de componente genético. A informação proveniente desse material é armazenada como um

código composto por cerca de 3 bilhões de bases nitrogenadas e mais de 99% delas são iguais em todos os humanos, o que ocorre a variabilidade de fenótipos é a ordem ou a sequência que as bases são transcritas, pois elas que determinam a informação disponível na construção de um organismo (GRIFFITHS *et al.,* 2016; VIVANTE; *et al.,* 2017).

Os cromossomos são formados por uma constituição em partes aproximadamente iguais de material genético e proteínas (histonas) e o conjunto desse material é denominado cromatina. Podemos ter dois tipos de cromatina, a eucromatina e a heterocromatina. A estrutura visível dos cromossomos (**Figura 2**) se apresenta em dois braços curtos (p), dois braços longos (q) e o centrômero que liga os braços maiores e menores. As extremidades dos braços dos cromossomos são compostas por uma estrutura de sequências repetidas, denominado telômero (GRIFFITHS *et al.,* 2016).

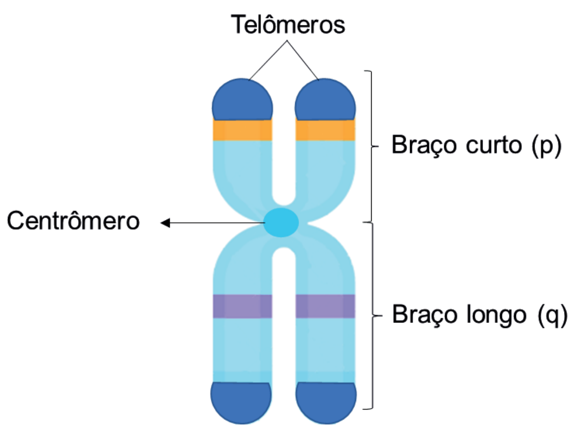


Figura 2. Estrutura de um cromossomo. A estrutura é definida pelos Braços longos (q) e curtos (p), centrômero ligando os braços e os telômeros dispostos nas extremidades superior e inferior.

Fonte: Autoria Própria (2020).

O trabalho tem como objetivo abordar a função dos telômeros na proteção do DNA e apontar seu papel em doenças humanas, salientando a importância na realização de estudos dos telômeros, pois podem auxiliar no diagnóstico e prognósticos de diversas patologias associadas à sua disfunção.

TELÔMEROS, O QUE SÃO?

A palavra telômero vem do grego antigo, *τέλος* (télos, extremidade) + *μέρος* (méros, parte), que significa "parte da extremidade". Os telômeros formam as porções finais das extremidades dos cromossomos e são constituídos de repetições não codificantes de

5’-TTAGGG-3’ (HERRMANN *et al.,* 2018).

Os telômeros são estruturas muito importantes de um cromossomo, sua principal função é a proteção do DNA, impedindo seu desgaste e podendo ser considerados o relógio biológico celular. Na medida em que nossas células se dividem para se multiplicar e para regenerar os tecidos e órgãos do nosso corpo, os telômeros dos cromossomos tornam-se mais curtos. Quando os telômeros ficam tão pequenos que já não são capazes de realizar sua função de proteção do DNA, as células param de se reproduzir sabendo que não podem se dividir mais, pois desgastariam o DNA, alcançando então o envelhecimento celular, ou senescência. Além de preservar a integridade do genoma, os telômeros também protegem os cromossomos de sofrerem alterações estruturais, como por exemplo, fusão com outros cromossomos (ALBERTS *et al.,* 2017; LEÃO *et al.,* 2018).

Os telômeros humanos são porções repetitivas de nucleotídeos não codificantes, presente nas extremidades dos cromossomos e que são associados a um complexo de seis proteínas, conhecido como *Shelterin.* Esse complexo de proteínas é responsável por manter a integridade do material genético, além de auxiliar na proteção contra danos excessivos no decorrer das divisões celulares. Outro subcomplexo de proteínas reveste o excesso rico em Guanina, que é característico de todas as nossas extremidades cromossômicas, regulando o acesso da telomerase. Com isso, ao limitar as extremidades dos cromossomos, o complexo protege o DNA telomérico da degradação indesejada e das fusões cromossômicas (SMITH; PENDLEBURY; NANDAKUMAR, 2019).

Naturalmente os telômeros se encurtam, mas é um problema quando se trata do encurtamento excessivo em células-tronco tanto de crianças quanto de adultos. O encurtamento telomérico pode ser revertido com uma enzima denominada telomerase, porém, essa enzima se apresenta em quantidades limitadas no corpo humano. Além do telômero se encurtar pelas replicações celulares, o estresse oxidativo ocasionado pelo estilo de vida individual também pode ser um fator de impacto na degradação deles (MARCON *et al.,* 2011 KONG; LEE; WANG, 2013).

Telômeros: O Relógio Biológico Celular

Os telômeros podem atuar como relógio biológico celular, pois o comprimento médio dos telômeros é considerado um biomarcador para envelhecimento, sobrevivência e mortalidade. Em células normais o limite de divisão, também conhecido como limite de Hayflick, se encontra entre 50 a 70 divisões antes da célula entrar em senescência ou apoptose. A degradação dos telômeros ocorre de forma multifatorial, podendo acontecer durante a replicação da célula (**Figura 3**) e também pelo estresse oxidativo (A SHAMMAS, 2011; WU, et al., 2020).

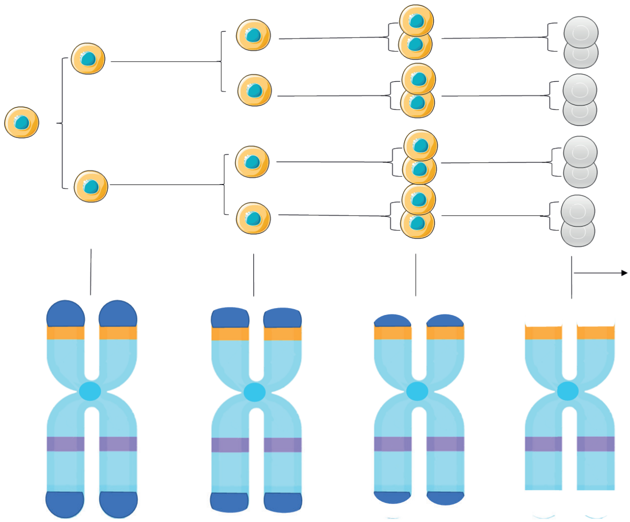


Figura 3. Erosão dos telômeros nas divisões celulares. Conforme a multiplicação celular ocorre, os telômeros vão se encurtando gradativamente. Quando os telômeros ficam extremamente encurtados as células param de se reproduzir alcançando então o envelhecimento celular.

Fonte: Autoria Própria (2020)

A enzima telomerase pode amenizar o encurtamento dos telômeros quando é capaz de interagir com eles, sendo assim, o comprimento dos telômeros e sua integridade são regulados de formas diferentes, e esse processo de regulação pode variar dependendo da condição em que a célula se encontra, como por exemplo situações de inflamação crônica ou aguda (WU; *et al.*, 2020).

TELOMERASE: É POSSÍVEL ALONGAR OS TELÔMEROS?

A principal forma de perda telomérica ocorre quando a maquinaria celular não é capaz de realizar a replicação completa das extremidades dos cromossomos e por conta disso, os telômeros estão sujeitos a ação das enzimas que degradam o material genético, conhecidas como nucleases. Por consequência da replicação celular, ocorre o encurtamento dos cromossomos a cada divisão celular na qual conduz a morte celular ou a senescência replicativa. Mas também o estresse oxidativo pode acelerar o encurtamento dos telômeros, presumivelmente porque o DNA telomérico rico em Guanina é particularmente vulnerável a danos oxidativos (ALBERTS *et al.,* 2017; SMITH; PENDLEBURY; NANDAKUMAR, 2019).

O alongamento do telômero ocorre principalmente pela enzima telomerase (*hTERT*), considerada uma grande ribonucleoproteína composta por duas principais subunidades: uma apresentando o modelo de RNA complementar ao DNA, chamada *hTERC* e a segunda, sendo um domínio catalítico denominada *hTERT*, tendo a característica de transcriptase

reversa, utilizando a fita de RNA molde para complementar o DNA telomérico. A telomerase atua ao final da replicação da fita descontínua, onde sobram nucleotídeos desemparelhados pois a maquinaria celular não consegue reconhecer o último *primer* e colocar suas bases complementares (ALBERTS *et al.,* 2017; GRIFFITHS *et al.*, 2016; SMITH; PENDLEBURY; NANDAKUMAR, 2019).

O gene *hTERT* que codifica a telomerase está inativo na maioria das células somáticas, mas que há exceções em que ele é transcrito, por exemplo em células tronco e células germinativas, de modo geral, em células que precisam ter sua autorenovação ilimitada. Esses são exemplos de tipos celulares que precisam passar por várias divisões, ou no caso de células germinativas, que precisam dar origem a um novo organismo, então precisam que seu telômero se mantenha (ALBERTS *et al.,* 2017; GRIFFITHS *et al.,* 2016).

TELÔMEROS E DOENÇAS HUMANAS

Células somáticas não neoplásicas tem um número limite de divisões estabelecido pelos telômeros, as divisões encurtam os telômeros e as células reconhecem que não podem se dividir mais, entrando em um estado de senescência. No caso de células em estado anormal, como no caso de neoplasias, o gene da telomerase é reativado, gerando o padrão de imortalização celular que é alcançado através da manutenção do comprimento dos telômeros, o que possibilita a rápida progressão da doença. O comprimento dos telômeros pela telomerase se torna um sistema compensatório, pois quanto mais divisões, mais a enzima atua na manutenção do comprimento telomérico (WU; *et al.*, 2020).

Embora o modelo padrão de tumorigênese para a maioria dos cânceres seja dado pelo aumento da taxa da telomerase e o alongamento dos telômeros, existem alguns tipos tumorais que conseguem continuar a proliferação indefinida com a telomerase hiperativada mas sem que os telômeros necessariamente se alonguem, como se faz no caso das doenças oncohematológicas (NOGUEIRA, *et al.*, 2020; ROPIO *et al.*, 2016). Também é visto em amostras de tecido de neoplasias de mama, colón e próstata, que os telômeros eram mais curtos quando comparados com amostras normais de tecido. Essa ocorrência pode estar associada com a progressão da doença e sua agressividade (HERRMANN *et al.*, 2018).

A instabilidade genética, que pode ser causada pelo encurtamento anormal dos telômeros e pelo acúmulo de mutações em genes de reparo do DNA, é outra característica das neoplasias, a qual pode desencadear rearranjos cromossomais e de genes, podendo levar a amplificações de genes alterados e seus produtos, e também pode-se observar aneuploidias cromossômicas, ou seja, cariótipos com mais ou menos que 46 cromossomos. Todas essas alterações citogenéticas podem ser decorrentes de quebras próximas aos telômeros e que podem aumentar o risco do desenvolvimento da neoplasia e piorar seu prognóstico (LEÃO *et al.,* 2018).

Também podem haver mutações que afetam a função e a biologia dos telômeros, como ocorre por exemplo na Disqueratose Congênita, na Síndrome de Hoveraal-Hreidarsson, na Síndrome de Revesz, na Anemia aplástica entre outras, e que resultam em telomeropatias que apresentam os telômeros mais curtos, podendo ser responsáveis pela evolução dos distúrbios para neoplasias (SAVAGE, 2014).

A IMPORTÂNCIA NO ESTUDO DO PAPEL DOS TELÔMEROS

Vários estudos tentam buscar uma associação entre o encurtamento acelerado de telômeros e um risco aumentado no desenvolvimento do câncer. Em um estudo publicado no normativo *Aging Study*, 800 pacientes sem câncer foram submetidos a medições periódicas do tamanho de seus telômeros. A taxa anual de encurtamento de telômeros em indivíduos que desenvolveram o câncer durante o acompanhamento foi duas vezes maior quando comparados com indivíduos que não desenvolveram câncer (HERRMANN *et al.*, 2018; HOU *et al.*, 2015).

Em um estudo prospectivo de 10 anos, utilizando o método de Bruneck, no qual há uma seleção randômica de uma população com números iguais de homens e mulheres estratificados por idade, obteve como resultado que os indivíduos com telômeros mais curtos apresentaram um risco maior no desenvolvimento de câncer e consequentemente a morte por conta desta doença (HERRMANN *et al.,* 2018; WILLEIT *et al.*, 2010).

A modulação da manutenção dos telômeros pela telomerase utilizando a terapia gênica podem alcançar resultados terapêuticos diferentes, podendo ajudar em aplicações antienvelhecimento que requerem a ativação da telomerase na manutenção e alongamento dos telômeros, pois esses pacientes geralmente apresentam um desgaste dos telômeros. Como também em aplicações anticâncer, que precisam da inibição da telomerase, pois sua hiperexpressão, pode ser observada em 85% dos pacientes com neoplasias, o que auxilia na imortalidade das células neoplásicas por conta do aumento dos telômeros (HONG; YUN, 2019).

CONCLUSÕES FINAIS

Por fim, é importante salientar que estudos dos telômeros e da telomerase, podem ajudar no diagnóstico de neoplasias, prognósticos e direcionar alvos terapêuticos com a finalidade de reduzir a expressão gênica da telomerase e como consequência, a produção em excesso da enzima telomerase. Pode ajudar também na reposição enzimática da telomerase e auxiliar em doenças relacionadas com o envelhecimento e mutações, revertendo o encurtamento telomérico excessivo (ARMSTRONG; TOMITA, 2017; HONG; YUN, 2019).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por tornarem possível que este trabalho fosse realizado.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.,* **Biologia Molecular da Célula.** 6° ed. Porto Alegre: Artmed, *2017*.

ARMSTRONG, Christine A.; TOMITA, Kazunori. **Fundamental mechanisms of telomerase action in yeasts and mammals: understanding telomeres and telomerase in cancer cells. Open Biology**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 160338, mar. 2017. The Royal Society.

A SHAMMAS, Masood. **Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 28-34, jan. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

GRIFFITHS, A. J. F.; Wessler, S.; Lewontin, R. & Carrol, S. (2016). **Introdução à Genética.** 11° ed. Ed. Guanabara Koogan.

HERRMANN, Markus *et al.,* **Telomere biology and age-related diseases**. Clin Chem Lab Med, [s.i], p.1-13, jan. 2018.

HONG, Jinwoo; YUN, Chae-ok. **Telomere Gene Therapy: polarizing therapeutic goals for treatment of various diseases. Cells**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 392, 28 abr. 2019. MDPI AG.

HOU, Lifang *et al.* **Blood Telomere Length Attrition and Cancer Development in the Normative Aging Study Cohort**. **Ebiomedicine**, [s.l.], v. 2, n. 6, p. 591-596, jun. 2015. Elsevier BV.

KONG, Chiou Mee; LEE, Xiao Wen; WANG, Xueying. **Telomere shortening in human diseases**. **Febs Journal**, [S.L.], v. 280, n. 14, p. 3180-3193, 24 jun. 2013.

LEÃO, Ricardo *et al.,* **Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) regulation: Clinical Impacts in Cancer**. Journal Of Biomedical Science, [s.l.], v. 25, n. 1, p.1-12, 12 mar. 2018. Springer Nature.

LENART, Peter; KREJCI, Lumir. Reprint of **"DNA, the central molecule of aging"**. Mutation Research/ fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis, [S.L.], v. 788, p. 25-31, jun. 2016. Elsevier BV.

MARCON, F.; SINISCALCHI, E.; CREBELLI, R.; SAIEVA, C.; SERA, F.; FORTINI, P.; SIMONELLI, V.; PALLI, D.. **Diet-related telomere shortening and chromosome stability**. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 49-57, 19 ago. 2011. Oxford University Press (OUP).

NOGUEIRA, Beatriz Maria Dias; MACHADO, Caio Bezerra; MONTENEGRO, Raquel Carvalho; MORAES, Maria Elisabete Amaral de; MOREIRA-NUNES, Caroline Aquino. **Telomere Length and Hematological Disorders: a review**. **In Vivo**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 3093-3101, 2020. Anticancer Research USA Inc.

ROPIO, Joana *et al.,* **Telomerase Activation in Hematological Malignancies**. Genes, [s.l.], v. 7, n. 9, p.61-74, 7 set. 2016. MDPI AG.

SAVAGE, Sharon A.. **Human Telomeres and Telomere Biology Disorders. Progress In Molecular Biology And Translational Science**, [s.l.], p. 41-66, 2014. Elsevier.

SMITH, Eric M.; PENDLEBURY, Devon F.; NANDAKUMAR, Jayakrishnan. **Structural biology of telomeres and telomerase**. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 61-79, 14 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

VIVANTE, Anat; BROZGOL, Eugene; BRONSHTEIN, Irena; GARINI, Yuval. **Genome organization in the nucleus: from dynamic measurements to a functional model**. Methods, [S.L.], v. 123, p. 128-137, jul. 2017. Elsevier BV.

WILLEIT, Peter *et al.* **Telomere Length and Risk of Incident Cancer and Cancer Mortality**. Jama, [s.l.], v. 304, n. 1, p. 69, 7 jul. 2010. American Medical Association (AMA).

WU, Lele; FIDAN, Kerem; UM, Jae-young; AHN, Kwang Seok. **Telomerase: key regulator of inflammation and cancer**. Key regulator of inflammation and cancer. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 155, p. 104726, maio 2020. Elsevier BV.

CAPÍTULO 10

ORGANOGÊNESE DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* Sims) POR MEIO DA TÉCNICA TCL (*THIN CELL LAYER*)

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 08/12/2020

Elias da Cruz Ribeiro
Universidade Federal do Amazonas
Manaus – Amazonas
http://lattes.cnpq.br/6575674221708277

Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília – Distrito Federal
http://lattes.cnpq.br/8504467572058575

Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília – Distrito Federal
http://lattes.cnpq.br/7270239356755951

Resumo: Visando solucionar problemas relacionados com a dificuldade de propagação e infecções virais, o cultivo *in vitro* tem sido considerado uma importante ferramenta para superar esses problemas. Dentre as diversas técnicas que podem ser aplicadas *in vitro*, a *Thin Cell Layer* (TCL) se destaca pela sua aplicabilidade diversa. Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de organogênese via TCL de *Passsiflora edulis Sims*. Adicionalmente, o acompanhamento morfoanatômico do processo foi realizado. Para tanto, ramos com cerca de 15 cm foram coletados em campo, a partir de cinco genitores elite: CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR. Após desinfestação, os ramos foram seccionados transversalmente em segmentos com cerca de 1-2 mm e inoculadas em placas de Petri com meio de cultura de MS suplementado com 4,45 μM de 6-Benzilaminopurina. O material foi mantido na ausência de luz durante 7 dias à 25±2ºC e, posteriormente, mantido sob a mesma temperatura e 16 horas de fotoperíodo. Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto aos percentuais de formação de calo e de brotos. Para a análise morfoanatômica, foram selecionadas explantes com brotações adventícias com 30 dias de cultivo. Após os processos de preparo das amostras para estudos anatômicos, cortes foram obtidos em micrótomo rotatório manual. Após os processos de montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os genótipos em relação à formação de calos e brotos organogênicos, com valores médios de 57,4% e 5,6%, respectivamente. Com base nestes resultados, conclui-se que a utilização da TCL pode ser uma técnica alternativa para a cultura do maracujazeiro. No entanto, faz-se necessário mais estudos analisando outros fatores que podem contribuir para melhoria das taxas de formação e alongamento de brotos como, por exemplo, a necessidade de suplementação dos meios com outros reguladores de crescimento.

PALAVRAS - CHAVE: Maracujazeiro. Micropropagação. TCL.

ORGANOGENESIS OF PASSION FRUIT (*Passiflora edulis* Sims) USING THE TCL TECHNIQUE (*THIN CELL LAYER*)

ABSTRACT: In order to solve problems such as propagation difficulties and viral infections, in vitro culture has been considered an important

tool to overcome these problems. Among the techniques that can be applied in vitro, the Thin Cell Layer (TCL) stands out for its diverse applicability. This work aimed to establish an organogenesis protocol via TCL for *Passiflora edulis* Sims. In addition, morphoanatomical monitoring of the process was carried out. For that, branches with about 15 cm were collected from five parents used for seed production: CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 and CPF1SSBR. After disinfestation, the branches were sectioned in segments of about 1-2 mm and inoculated in Petri dishes with MS culture medium supplemented with 4.45 μM of 6-Benzylaminopurine.The material was kept in the absence of light for 7 days at 25 ± 2ºC and, subsequently, kept under the same temperature and 16 hours photoperiod. After 30 days, the explants were evaluated for the percentage of callus formation and organogenic shoots. For morphoanatomical analysis, explants with adventitious shoots with 30 days of cultivation were selected. The fixation, dehydration and infiltration processes of the samples were performed and cuts were obtained in a rotating manual microtome. After the assembly processes, the slides were analyzed under a microscope. No statistical differences were detected between genotypes in relation to the formation of calluses and organogenic shoots, with average values of 57.4% and 5.6%, respectively. Based on these results, it is concluded that the use of TCL can be an alternative technique for the cultivation of passion fruit. However, further studies are needed analyzing other factors that may contribute to improving the formation rates and elongation of organogenic shoots, such as, for example, the need for media supplementation with other growth regulators.

KEYWORDS: Passion fruit. Micropropagation. TCL.

1 | INTRODUÇÃO

O cultivo do maracujazeiro tem crescido longo dos anos, tanto nacional como internacionalmente. No Brasil, ocorrem cerca de 150 espécies distribuídas em quatro gêneros, sendo *Passiflora edulis* Sims e *P. alata* as mais cultivadas mundialmente (BERNACCI, 2003; JUNQUEIRA et al., 2005). A espécie P. *edulis* é a mais utilizada para produção e comercialização de frutos, concentrando maiores investimentos em pesquisa para melhorar a produtividade (MELETTI, 2011). No entanto, outras espécies possuem características de interesse, assim como propriedades medicinais cientificamente reconhecidas. Dentre elas, cita-se a *P. foetida*, a qual apresenta ação antibacteriana (MOHANASUNDARI et al., 2007).

O cultivo *in vitro* do maracujazeiro tem sido aplicado como alternativa para multiplicação de material livre de fitopatógeno e, apesar de apresentar sucesso na limpeza clonal do material, a multiplicação do material *in vitro* ainda pode ser aperfeiçoada (PRAMMANEE et al., 2011).

Dentre as diversas técnicas que podem ser aplicadas *in vitro,* a *Thin Cell Layer* (TCL) (VAN, 1973) se destaca pela sua aplicabilidade diversa (Nhut et al., 2003). Pode ser aplicada para obtenção de embriões somáticos, brotações, raízes, entre outros (SILVA; FUKAI, 2003). Um dos fatores mais importantes da técnica refere-se a espessura do explante, pois permite um maior controle sobre as varáveis endógenas e exógenas dos

tecidos, que influenciam as respostas morfogênicas (NHUT et al., 2003). Por isso, a técnica pode ser classificada conforme o corte realizado, podendo ser transversalmente (tTCL) ou longitudinalmente (lTCL), com particularidades em relação aos tipos de células presentes em cada corte (SILVA; DOBRÁNSZKI, 2013).

A aplicação da técnica TCL é pouco documentada no cultivo *in vitro* de maracujazeiro. Nhut et al. (2007) testaram a ação de diversos reguladores em explantes de *P. edulis* Sims com espessura de 1 mm e indicaram a concentração de 4,45 μM de 6-Benzilaminopurina (BAP) como a melhor para regeneração de brotos.

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade da utilização da técnica tTCL para propagação in vitro de cinco genótipos elite de *Passiflora edulis* Sims. Adicionalmente, o acompanhamento morfoanatômico do processo foi realizado. Adicionalmente, objetivou-se investigar em termos anatômicos as repostas morfogênicas obtidas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF. Para a montagem do experimento, foram utilizados como fornecedores dos explantes, cinco genótipos elite de maracujazeiro (Passiflora edulis Sims), a saber: CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR. O material foi proveniente da Embrapa Produtos e Mercado, situada em Riacho Fundo II, Brasília, DF, e pertence ao Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF.

Em laboratório, brotos coletados foram reduzidos a aproximadamente 3 cm e tiveram todas as folhas retiradas, deixando apenas uma gema lateral em cada microestaca. Posteriormente, as microestacas foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaClO) (1% de cloro ativo) e 3 gotas de Tween-20 por 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada e autoclavada.

Com o auxílio de pinça e bisturi, foram removidas as extremidades da estaca para evitar oxidação pelo hipoclorito e os segmentos internodais foram então seccionados transversalmente em explantes com cerca de 1-2 mm de espessura (Figura 1A). Uma vez seccionados, os explantes foram inoculadas imediatamente em placas de Petri (15 x 90 mm) com meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 $g.L^{-1}$ de sacarose, 4,45 μM de 6-Benzilaminopurina (BAP), conforme Nhut *et al.* (2007). Para a solidificação do meio de cultura foram adicionados 2,5 $g.L^{-1}$ de *Phytagel*® (SIGMA).

O material foi mantido na ausência de luz durante 7 dias, à 25±2 ºC. Após esse período, os explantes foram levados para sala crescimento sob condições de 16 h de fotoperíodo e irradiação de 100 µmol.m-2.s-1. O delineamento utilizado foi o inteiramente

casualizado com 5 tratamentos (genótipos citados anteriormente) com 3 repetições cada, sendo 20 explantes por repetição (placa). Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto aos percentuais de brotações adventícias e formação de calo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R.

Para a análise morfoanatômica, explantes com brotações adventícias de 30 dias de cultivo foram selecionados. Os processos de fixação, desidratação e infiltração das amostras foram realizados conforme Silva-Cardoso et al. (2019). Cortes (3 a 5 μm) foram obtidos em micrótomo rotatório manual (Leica® RM2125RT), distendidos em chapa aquecedora à 45 ºC e aderidos às lâminas microscópicas. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (1%) (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 10 dias de cultivo em meio com citocinina, observou-se intumescimento na maioria dos explantes, em todos os genótipos (Figura 1 B). Após 20 dias de cultivo, verificou-se a formação de brotações adventícias na maioria dos genótipos, com exceção do CPMSC1. Ao final de 30 dias de cultivo todos os genótipos apresentaram pelo menos um explante com brotações adventícias (Figura 1C). A análise dos resultados não identificou diferenças estatísticas entres os genótipos em relação à formação de brotações e calos, com valores médios de 5,8%, 61%, respectivamente.

Nnhut et al. (2007) testaram diferentes reguladores de crescimento e obtiveram 100% de regeneração de brotos de P. *edulis* Sims em meio MS acrescido de 4,45 μM de BAP, obtendo formações semelhantes às obtidas neste estudo (Figura 1C). Estudos com TCL reportaram altas porcentagens de brotação nos explantes. Silva e Fukai (2003), por exemplo, testaram a influência de diversos reguladores de crescimento em Crisântemo (*Dendranthema grandiflorum* Ramat Kitamura), obtendo 82% de explantes com brotação em MS acrescido de 4,45 μM de BAP.

A espessura do corte utilizada neste estudo (1-2 mm) pode ter influenciado na baixa porcentagem de brotações obtidas. Estudos realizados por Nhut et al. (2001), demonstraram a importância da espessura do explante, obtendo maior taxa de brotações e de explantes vivos com corte de espessura entre 3 – 4 mm. Na maioria dos trabalhos com uso da técnica TCL, a ocorrência de calos é recorrente (NHUT et al., 2001; SILVA; FUKAI, 2003), o que pode estar relacionado ao próprio estresse ocasionado pelo seccionamento do explante, além da resposta ao regulador utilizado ou ao possível estresse causado pelas condições de cultivo.

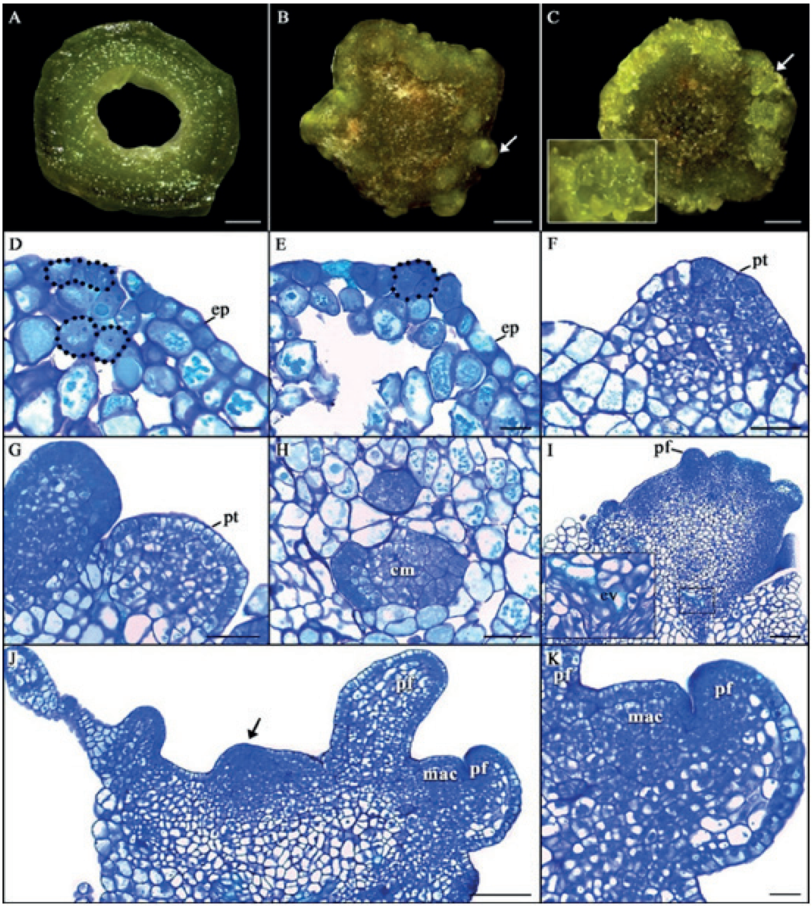


FIGURA 1 - Aspecto morfoanatômico da organogênese a partir de explantes internodais segmentados em *Thin Cell Layer* (TCL) de *Passiflora edulis*. A. Explante internodal imediatamente antes do cultivo. B: Explante internodal intumescido após 10 dias de cultivo; observar protuberâncias (seta). C: Explante com gemas adventícias (seta) após 20 dias de cultivo. D: Segmento foliar com células epidérmicas e subepidérmicas com características meristemáticas (pontilhado). E: Divisões em células epidérmicas (pontilhado). F, G: Protuberâncias oriundas de divisões de células periféricas do explante. H: Centros meristemáticos na região interna do explante. I: Brotação adventícia em formação; notar conexão vascular na região inferior (retângulos). J, K: Secção anatômica evidenciando protuberância (seta) e gema adventícia com primórdios foliares e meristema apical caulinar evidentes. K: Detalhe de primórdio foliar e meristema apical caulinar. Abreviações: (cm) centro meristemático, (ep) epiderme, (ev) elemento de vaso, (mac) meristema apical caulinar, (pf) primórdio foliar e (pt) protuberância. Barras = A: 0,5 mm; B, C: 1 mm, D, E, K: 0,025 mm, F-H: 0,05 mm e I, J: 0,1 mm.

As análises morfoanatômicas revelaram o envolvimento de células epidérmicas e subepidérmicas dos explantes com a formação de brotações adventícias (Figura 1D-K). Essas células adquiriram características meristemáticas, como núcleos e nucléolos evidentes e alta relação núcleo/citoplasma (VERDEIL et al., 2007) (Figura 1D, E) e

dividiram-se formando protuberâncias (Figura 1F, G), similares aquelas reportadas por Fernando et al. (2007), das quais as gemas adventícias foram originadas. Salienta-se que as gemas se desenvolveram preferencialmente sobre a parte superior do explante, a qual não apresentava contato direto com o meio de cultura, assim como mencionado por Rocha, Monte-Bello e Dornelas (2015).

Verificou-se também conexão vascular entre as gemas formadas e o explante de origem (Figura 1I), confirmando a ocorrência da rota organogênica. Essa rota é considerada predominante em *Passiflora* spp. e tem sido comumente relatada a partir de variadas fontes de explantes, como hipocótilos (FERNANDO et al., 2007), explantes foliares (BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004), raízes (SILVA et al., 2011) e embriões zigóticos (ROCHA; MONTE-BELLO; DORNELAS, 2015). As brotações obtidas apresentavam meristema apical e primórdios foliares evidentes (Figura 1J, K).

4 I CONCLUSÃO

A técnica tTCL pode ser utilizada para multiplicação dos genótipos de *Passiflora edulis* Sims estudados. Porém, faz-se necessário mais estudos analisando outros fatores que podem ter contribuído para a baixa taxa de formação de brotos, como espessura dos cortes e necessidade de suplementação do meio de cultura com outros reguladores de crescimento.

AGRADECIMENTOS

À FAPEAM pelo auxílio financeiro conferido ao primeiro autor. À Embrapa por ceder espaço e equipamentos para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. **Age and physiological condition of donor plants affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. flavicarpa**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Holanda, v. 79, n. 1, p. 87–90, 2004.

BERNACCI, L. C. *Passifloraceae*. Em: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S.; GIULIETT, A. M.; KIRIZAWA, M (Eds). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa, 2003. v. 3, p. 247–274. ISBN 85-7523-054-9.

FERNANDO, J. A; VIEIRA, M. L. C.; MACHADO, S. R.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. **New insights into the in vitro organogenesis process: The case of *Passiflora***. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 91, n. 1, p. 37–44, 2007.

UNQUEIRA, N. T. V; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero Passiflora L. Em: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81–92. ISBN 978-94-017-3522-3.

MELETTI, L. M. M. **Avanços na cultura do maracujá no Brasil**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 33, n. spe1, p. 83–91, out. 2011.

MOHANASUNDARI, C.; NATARAJAN, D.; SRINIVASAN, K.; UMAMAHESWARI, S.; RAMACHANDRAN, A. **Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. a common exotic medicinal plant**. African Journal of Biotechnology, v. 6, n. 23, p. 2650–2653, 31 dez. 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures**. Physiologia Plantarum, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.

NHUT, D. T.; VAN LE, B.; TANAKA, M.; TRAN THANH VAN, K. **Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissues of *Lilium longiflorum***. Scientia Horticulturae, v. 87, n. 1–2, p. 131–138, 2001.

NHUT, D. T.; SILVA, J. A. T.; VAN LE, B.; T.; TRAN THANH VAN, K. Thin cell layer studies of vegetable, leguminous and medicinal plants. Em: NHUT, D. T.; VAN LE, B.; TRAN THANH VAN, K.; THORPE, T (Eds.). **Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applica- tions.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 387–425. ISBN 978-94-017-3522-3.

NHUT, D. T; KHIET, B.L.T.; THI, N.N.; THUY, D.T.T.; DUY, N.; HAI, N.T.; HUYEN, P.X. High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. Flavicarpa) via Thin Cell Layer (TCL) technology. Em: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (Eds.). **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer, 2007. p. 417–426. ISBN 978-1-4020-6352-7.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. **Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O**. Protoplasma, v. 59, p. 368–373, jun. 1964.

PRAMMANEE, S.; THUMJAMRAS*, S.;* CHIEMSOMBAT, P.; PIPATTANAWONG, N. **Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants**. Crop Protection, v. 30, n. 11, p. 1425–1429, nov. 2011.

ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. **Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from in vitro cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (P*assiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 120, n. 3, p. 1087–1098, 2015.

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Anatomical and histochemical studies of the somatic embryogenesis of *syagrus oleracea* from immature inflorescences**. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 19, n. 4, p. 444–450, 2019.

SILVA, C. V.; OLIVEIRA, L. S.; LORIATO, V. A. P.; SILVA, L. C.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. **Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, P. cincinnata Masters**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 107, n. 3, p. 407–416, 2011.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. **Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration**. Journal of Plant Growth Regulation, v. 32, n. 4, p. 922–943, 2013.

SILVA, J. A. T.; FUKAI, S**. Chrysanthemum Organogenesis Through Thin Cell Layer Technology and Plant Growth Regulator Control**. Asian Journal of Plant Sciences, v. 2, n. 6, p. 505–514, 1 jun. 2003.

Van, M. T. T. **Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L**. Planta 115: 87-92, 1973.

VERDEIL, J. L.; ALEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRAMBARGER, T. J. **Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy?** Trends in Plant Science, v. 12, n. 6, p. 245–252, 2007.

CAPÍTULO 11

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO DO CRAMBE SOB DIFERENTES DOSES DE ADUBAÇÃO NITROGENADA

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 18/12/2020

Víctor dos Santos Rosa de Oliveira
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ

Rafael Hydalgo Passeri-Lima
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ

Juliana Correa Araújo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ

João Pedro Vanderlei Machado
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ

Bruna Rafaela da Silva Menezes
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ

RESUMO: O crambe (*Crambe abssynica* Hochst) é uma cultura de inverno que pode ser utilizada para a alimentação animal ou para a produção de biodiesel. Ainda existem poucas informações na literatura sobre condições de manejo e algumas características como a qualidade fisiológica das sementes. Com isso, os objetivos deste trabalho foram avaliar características morfoagronômicas e de produção, aos 40 e 80 dias após a emergência média, em diferentes doses de adubação nitrogenada e avaliar a qualidade fisiológica de sementes de crambe. O experimento foi realizado no campo experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. A cultivar utilizada foi a FMS Brilhante avaliada em cinco doses de adubação nitrogenada (0, 30, 60, 90, 120 kg ha^{-1}). A cultura apresentou ciclo de 80 dias e, por isso, as avaliações foram feitas aos 40 dias e no final do ciclo cultural. Após a colheita, as sementes foram submetidas a quatro tratamentos: sementes com tegumento e sem ácido giberélico (GA_3), sementes sem tegumento e sem ácido giberélico, sementes com tegumento e com ácido giberélico, e sementes sem tegumento e com ácido giberélico. Posteriormente, as sementes de cada tratamento foram avaliadas quanto a sua qualidade fisiológica pelos testes de primeira contagem e de germinação. Houve tendência de aumento da altura da planta tanto aos 40 quanto aos 80 dias após a emergência com aumento das doses de nitrogênio. Comportamento semelhante foi observado para a produção de sementes. A retirada do tegumento e a adição de GA_3 contribuíram para a melhoria da qualidade fisiológica de sementes de crambe.

PALAVRAS - CHAVE: *Crambe abyssinica* Hochst; germinação; produção.

PHYSIOLOGICAL QUALITY OF SEEDS AND DEVELOPMENT OF CRAMBE UNDER DIFFERENT DOSES OF NITROGEN FERTILIZATION

ABSTRACT: Crambe (*Crambe abssynica* Hochst) is a winter crop that can be used to feed an animal or to produce biodiesel. There is still information about the literature on management

conditions and some characteristics such as the physiological quality of seeds. Thus, the objectives of this work were to evaluate the morpho-agronomic and production characteristics, at 40 and 80 days after the medium emergence, in different doses of nitrogen fertilization and to evaluate a physiological quality of crambe seeds. The experiment was carried out in the experimental field of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. The design was completely randomized, with four replications. A cultivar used for FMS Brilhante evaluated in five doses of nitrogen fertilization (0, 30, 60, 90, 120 kg ha-1). The culture presented 80 days and, therefore, the tests were done at 40 days and at the end of the cultural cycle. After harvesting, the seeds were submitted to four treatments: seeds with tegument and without gibberellic acid (GA3), seeds without tegument and without gibberellic acid, seeds with tegument and with gibberellic acid, and seeds without tegument and with gibberellic acid. Subsequently, the seeds of each treatment were evaluated for their physiological quality by the first count and germination tests. There was a tendency to increase plant height both at 40 and 80 days after emergence with an increase in nitrogen doses. Similar behavior was observed for seed production. The removal of the tegument and the addition of GA_3 contributed to the improvement of the physiological quality of crambe seeds.
KEYWORDS: *Crambe abyssinica* Hochst; germination; production.

INTRODUÇÃO

O crambe (*Crambe abssynica* Hochst) é originário da África e domesticado na Europa (Knights, 2003). Diversas áreas no Brasil estão aptas para a produção de crambe. Os estados do Mato Grosso do Sul e Goiás, são os maiores produtores, sendo suas áreas plantadas de 3 mil hectares e 3,5 mil hectares no ano de 2011, respectivamente. Esta cultura pode ser utilizada principalmente pela indústria de óleos vegetais, grãos e farelos (Jasper et al., 2010; Zoz et al., 2012). Sua rusticidade, resistência ao déficit hídrico e ciclo curto (até 90 dias), além de ser uma cultura de inverno, tem despertado o interesse de muitos produtores (Pitol et al, 2010).

O óleo de crambe pode ser usado como lubrificante industrial, inibidor de corrosão, e como ingrediente na fabricação de borracha sintética, contém de 50 a 60% de ácido erúcico, um ácido graxo de cadeia longa, que é usado na fabricação de filmes plásticos, plastificantes, nylon, adesivos e isolante elétrico (Oplinger et al., 1989). A torta e/ou farelo, subproduto da extração do óleo, apresenta índices de até 45% de proteína bruta e, pode ser utilizado como suplementos protéicos em alimentação de ruminantes (Carlson et al., 1996).

As sementes da espécie são ortodoxas, do tipo cariopse (Souza et al., 2009). O potencial fisiológico das sementes é traduzido em capacidade desta em desempenhar suas funções vitais, caracterizando-se pela longevidade, germinação e vigor (Toledo et al. 2009). A dormência em sementes de algumas espécies pode ser proporcionada pelo tegumento pelo fato de ser impermeável a água, porém retirada desta estrutura pode acelerar o processo de germinação (Santarém & Aquila, 1995).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar características morfoagronômicas e de produção, aos 40 e 80 dias após a emergência média, em diferentes doses de adubação nitrogenada e avaliar a qualidade fisiológica de sementes de crambe.

MATERIAL E MÉTODOS

Implantação do experimento

O experimento foi conduzido no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Fitotecnia/IA. A cultivar utilizada foi a FMS Brilhante. Foram utilizadas cinco doses de adubação nitrogenada (0, 30, 60, 90, 120 kg ha^{-1}) com sulfato de amônio. A adubação foi realizada no momento do plantio. O plantio será realizado em vasos de 9 L e, estes mantidos em local aberto. Foram semeadas 20 sementes por vaso e, após desbaste foram mantidas apenas duas plantas por vaso. As plantas foram avaliadas quanto características morfoagronômicas aos 40 e 80 dias (colheita) após a emergência média.

Figura 1: Planta de crambe aos 40 dias após a emergência média.

Avaliação das características morfoagronômicas e de produção

As características morfoagronômicas e de produção avaliadas foram: altura de planta (ALT, em cm): sendo a distância entre a superfície do solo e o ápice da planta, foi medida com auxílio de um trena; diâmetro do caule (DC, em mm): foi feito medições rente ao solo, utilizando paquímetro digital; número de ramos por planta (NR): foi obtido por contagem dos ramos em cada planta; altura do primeiro ramo produtivo (ARP, em cm): foi obtida à medida correspondente da distância entre a superfície do solo até o primeiro ramo produtivo; peso do crambe (PC, em g): foi obtido pesando com uma balança de precisão o peso total das sementes produzidos pela planta.

Avaliação da qualidade fisiológica das sementes

Após secagem em temperatura ambiente as sementes de crambe foram submetidas a quatro diferentes tratamentos: sementes com tegumento e sem ácido giberélico (CTSG); sem tegumento e sem ácido giberélico (STSG); com tegumento e com ácido giberélico (CTCG); sem tegumento e com ácido giberélico (STCG). A retirada das sementes foi realizada manualmente e a concentração de ácido giberélico utilizada foi a de 500 mg L^{-1}.

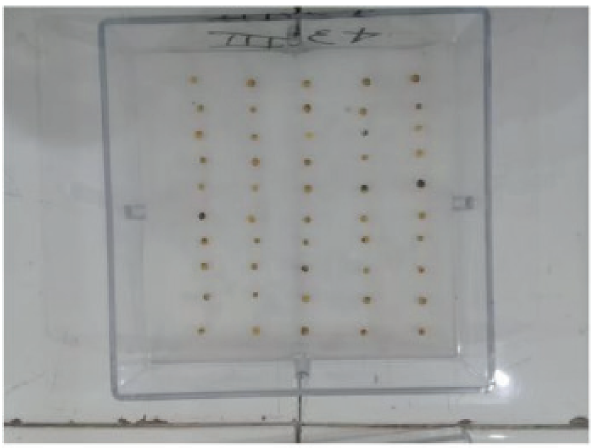


Figura 2: sementes de crambre submetidas ao teste de germinação.

As análises para a qualidade fisiológicas das sementes forma: teor de água: determinado pelo método da estufa, a 105ºC, durante 24 horas, com utilização de duas repetições, conforme metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009); primeira contagem do teste de germinação (PG%): realizada em conjunto com o teste de germinação, sendo utilizadas 50 sementes por repetição, colocadas para germinar em substrato de papel, a 25 °C, sendo realizada contagem das plântulas normais, no 4º dia após o início do teste. O papel foi umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a sua massa seca, de forma a uniformizar o teste (Brasil, 2009); teste de germinação (G%): foram utilizadas 50 sementes por repetição, colocadas para germinar em substrato de papel, a 25 °C, sendo realizada contagem das plântulas normais, no 7º dia após o início do teste. O papel foi umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a sua massa seca, de forma a uniformizar o teste (Brasil, 2009).

Análise estatística

Para a avaliação dos efeitos da adubação nitrogenada no desenvolvimento das plantas do crambe aos 40 e 80 dias após a emergência média foi utilizado o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Os tratamentos foram

cinco doses de adubação nitrogenada (0, 30, 60, 90, 120 kg ha^{-1}). Foi realizado análise de variância e de regressão. Para avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de médias e análise de regressão e das diferentes doses de nitrogênio

A altura da planta (ALT) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, aos 40 DAE, pelo teste de médias (Tabela 1). No entanto, a análise de regressão demonstrou que houve resposta positiva das plantas à adubação nitrogenada para esse parâmetro, em que ocorreu o aumento linear da altura das plantas em função do aumento da dose de nitrogênio aplicada (Figura 3 A). Isso corrobora com o experimento de Vechiatto & Fernandes (2011), em que as plantas de crambe avaliadas aos 45 e 60 DAE, também apresentaram aumento da média de altura em função do aumento da dose de nitrogênio aplicada.

Para número de ramos por planta (NRP), aos 40 dias, observou-se que houve diminuição significativa do número de ramos na dose de 90 kg ha^{-1} de nitrogênio em comparação às doses de zero (controle) e de 30 kg ha^{-1} de nitrogênio, pelo teste de médias (Tabela 1), porém, o efeito dessa dose não diferiu significativamente do efeito das doses de 60 e 120 kg ha^{-1} de nitrogênio. Essa tendência de decréscimo do NRP em função do aumento da dose de nitrogênio foi confirmada na análise de regressão, que demonstra uma diminuição linear da característica, quanto maior a dose de N aplicada (Figura 3B). Esse resultado difere do avaliado aos 80 DAE, em que as médias não diferiram significativamente entre si sob os diferentes tratamentos (Tabela 2).

Em relação a variável diâmetro do colmo (DC) aos 40 dias após a emergência verifica-se que não houve diferenças significativas entre as médias das diferentes doses de nitrogênio ($P>0,05$), sendo a média geral observada de 7,05 mm (Tabela 1). No entanto, verifica-se na análise de regressão que o modelo quadrático foi significativo ($P>0,05$), com coeficiente de determinação de 91,83% (Figura 3 C). A análise indica que houve tendência de aumento do DC com o ponto máximo aos 60 kg ha^{-1}. Posteriormente, ocorreu redução do DC com o aumento da dose de nitrogênio.

Ao observar a altura do primeiro ramo (APR) aos 40 dias verifica-se que houve diferenças significativas entre as médias de zero (controle) e 30 kg ha^{-1} de nitrogênio e a dose de 60 kg ha^{-1} de nitrogênio ($P<0,05$) (Tabela 1). Isso indica que nesse estádio de desenvolvimento sob a dosagem de 60 kg ha^{-1} de nitrogênio houve uma redução da APR, o que pode também ser observado na análise de regressão para a característica (Figura

3D). Esta variável é importante ser avaliada, pois interfere na colheita mecanizada (Oliveira et al., 2018).

Tratamento	ALT	NRP	DC	APR
0 de N	22,92 a	8,60 a	5,88 a	4,26 a
30 de N	25,20 a	8,60 a	6,89 a	4,26 a
60 de N	27,27 a	7,20 ab	7,60 a	1,96 b
90 de N	31,80 a	5,80 b	8,05 a	3,00 ab
120 de N	31,88 a	6,60 ab	6,81 a	3,33 ab
Média geral	27,81	7,36	7,05	3,36
$QM_{resíduo}$	27,12	1,46	1,79	1,24
CV (%)	18,72	16,42	18,99	33,16

ALT: altura da planta, em cm; NRP: número de ramos por planta; DC: diâmetro de caule, em mm; APR: altura do primeiro ramo, em cm. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1: Médias de cinco características em função de diferentes doses de adubação nitrogenada aos 40 dias após a emergência (Seropédica, RJ, 2019).

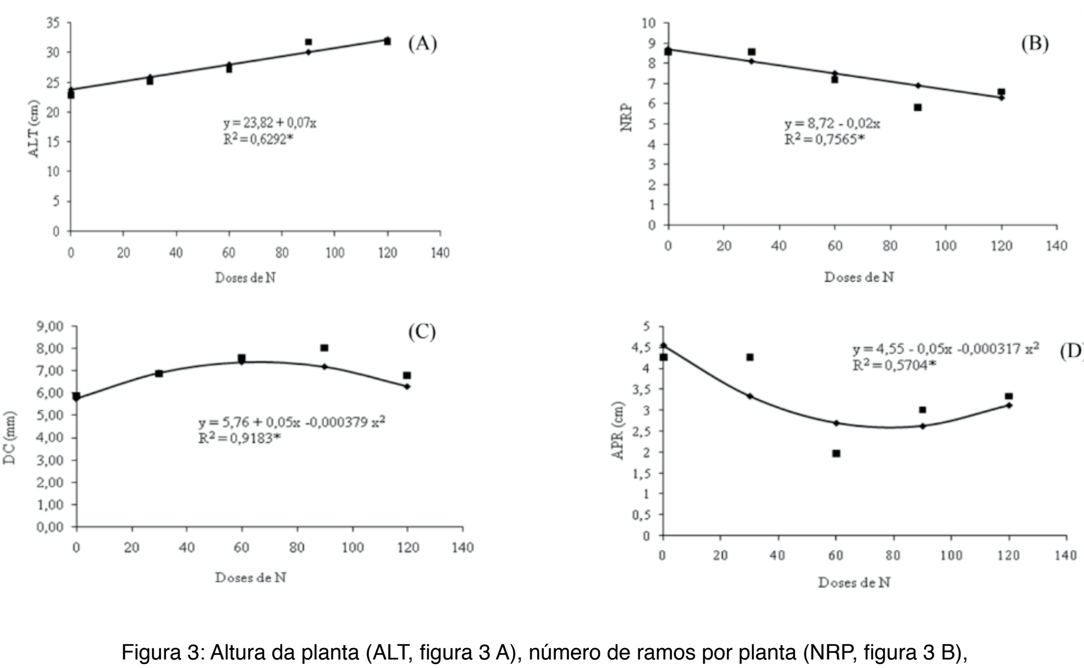


Figura 3: Altura da planta (ALT, figura 3 A), número de ramos por planta (NRP, figura 3 B), diâmetro do colmo (DC, figura 3 C) e altura do primeiro ramo (APR, figura 3 D) aos 40 dias após a emergência em função de diferentes doses de nitrogênio (Seropédica, RJ, 2019). * Significativo a 5% de probabilidade.

Diferentemente do avaliado aos 40 dias após a emergência, em que não houve diferença significativa das médias para o parâmetro altura das plantas (ALT), aos 80

DAE, o tratamento com concentração de 60 kg ha^{-1} de nitrogênio apresentou média significativamente menor em relação aos tratamentos de 90 e 120 kg ha^{-1} de nitrogênio (Tabela 2). A análise de regressão, porém, demonstra que as plantas foram responsivas nessa característica em todas as doses de nitrogênio, aumentando a altura das plantas de forma linear ao aumento das doses de N aplicadas (Figura 4 A).

Aos 80 dias após a emergência, semelhantemente ao o que ocorreu no teste de média aos 40 dias após a emergência, não houve diferenças significativas entre as médias das diferentes doses de nitrogênio para o parâmetro diâmetro do colmo (DC) (P>0,05) (Tabela 2). Porém, os modelos linear e quadrático não foram significativos na análise de regressão. A média geral para a característica foi de 8,97 mm. Souza & Chaves (2017), ao avaliarem o crescimento e produção do crambe em diferentes doses de nitrogênio, verificaram que o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático em relação do DC em diferentes doses de N, com valor máximo de diâmetro de 10,93 mm, em dose de 120 kg.ha^{-1} de N, média acima as encontradas no presente estudo na época da colheita.

Diferentemente do observado aos 40 dias após a emergência, a média para a APR, na época da colheita verifica-se que não houve diferença significativa (P>0,05) entre as médias das doses de zero (controle), 30 e 60 kg ha^{-1} de nitrogênio (Tabela 2). Em relação a análise de regressão, o modelo que melhor explicou os resultados de APR foi o linear. Isso indica que ocorre o aumento da APR com o aumento da dose de adubação com nitrogênio (Figura 4 B). Os valores encontrados nas doses de 90 e 120 kg ha^{-1} de nitrogênio (11,30 e 10,80, respectivamente) corroboram com os observados em Oliveira et al. (2018), onde foram encontrados valores entre 8,07 a 15,30 cm ao avaliarem diferentes genótipos de crambe.

A produção de sementes, medida em gramas de sementes por vaso, apresentou resultado significativamente maior das médias em comparação à dose testemunha (zero), nas concentrações de 30 e 90 kg ha^{-1} de nitrogênio. A análise de regressão, porém, demonstrou aumento de produção quanto maior a dose de nitrogênio aplicada, em que a produção aumentou abruptamente na dose de 30 kg ha^{-1} de N em comparação com a testemunha, e outro salto abrupto quando a dose foi aumentada de para 120 kg ha^{-1} de nitrogênio. Esse resultado difere do encontrado por Souza et al. (2014), em que a média de produção de sementes não diferiu significativamente entre si em função do aumento da concentração de N aplicada.

Tratamento	ALT	NRP	DC	APR	PS
0 de N	79,44 ab	10,40 a	9,17 a	4,74 c	4,41 b
30 de N	85,00 ab	8,80 a	9,54 a	5,89 c	7,77 a
60 de N	73,60 b	10,60 a	9,15 a	7,16 bc	6,04 ab
90 de N	97,60 a	8,60 a	8,10 a	11,30 a	6,93 a
120 de N	96,80 a	10,60 a	8,88 a	10,80 ab	6,69 ab
Média geral	86,49	9,80	8,97	7,98	6,36
$QM_{resíduo}$	111,99	5,98	1,60	3,91	1,64
CV (%)	12,24	24,95	14,11	24,79	20,12

ALT: altura da planta, em cm; NRP: número de ramos por planta; DC: diâmetro de caule, em mm; APR: altura do primeiro ramo, em cm; PS: peso de sementes, em g. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2: Médias de cinco características em função de diferentes doses de adubação nitrogenada aos 80 dias após a emergência (Seropédica, RJ, 2019).

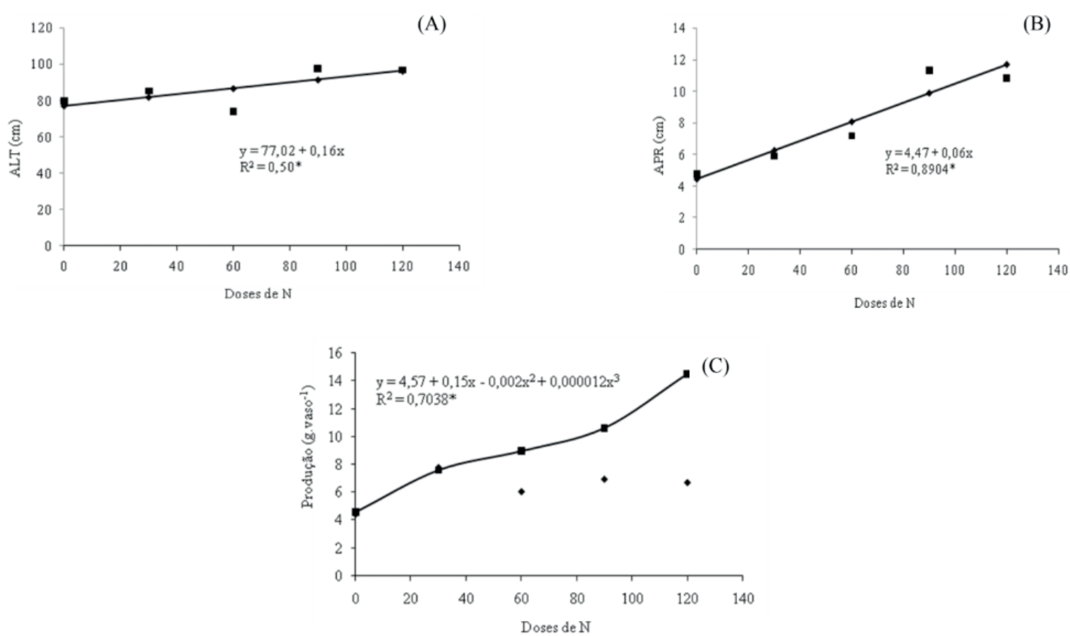


Figura 4: Altura da planta (ALT, figura 4 A), altura do primeiro ramo (APR, figura 4 B) e produção (Produção, figura 4 C) em função de diferentes doses de nitrogênio (Seropédica, RJ, 2019). * Significativo a 5% de probabilidade.

Teste de média para a análise da qualidade fisiológica das sementes

As sementes de crambe apresentaram teor de água de 9,8%. Para a análise fisiológica das sementes, foram usados quatro tratamentos: sementes com tegumento e

sem ácido giberélico (GA_3), sementes sem tegumento e sem ácido giberélico, sementes com tegumento e com ácido giberélico, e sementes sem tegumento e com ácido giberélico. A qualidade fisiológica das sementes foi analisada pelos testes de germinação e primeira contagem (Tabela 3).

O tratamento com tegumento e sem adição de GA_3 foi o que apresentou menor percentual de plântulas normais na primeira contagem (PC) em relação aos tratamentos com tegumento e sem tegumento com a adição de GA_3. O tratamento sem tegumento e sem adição de GA_3 (tratamento controle) foi o que apresentou menor porcentagem de germinação. No entanto, o tratamento sem tratamento e com GA_3 foi o que apresentou significativamente maiores valores de porcentagem de germinação. Desta forma, pode-se inferir que a adição de GA_3 contribuiu para o aumento da germinação em sementes de crambe.

De acordo com Gutormson et al (1992), para determinar a superação da dormência de sementes de crambe sob diferentes tratamentos para quebra ou diminuição da dormência, em que foi demonstrado que a adição de ácido giberélico, apesar de aumentar o percentual de germinação, diminui o número de plântulas normais na primeira contagem. Essa diferenciação pode estar ligada às diferentes concentrações de GA_3 utilizadas, por isso se faz necessário novos experimentos para resultados conclusivos. Na concentração de GA_3 utilizada neste trabalho não foi observada essa redução na primeira contagem, pois os tratamentos com GA_3 apresentaram valores que não se diferiram estatisticamente do tratamento controle.

Tratamento	PC (%)	G (%)
Com tegumento e sem GA_3	15,00 b	67,62 b
Sem tegumento e sem GA_3	22,00 ab	55,00 c
Com tegumento e com GA_3	24,50 a	63,12 b
Sem tegumento e com GA_3	30,50 a	78,00 a
Média geral	23,00	65,94
$QM_{resíduo}$	17,33	12,24
CV (%)	18,10	5,31

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3: Porcentagem de plântulas normais na primeira contagem (PC%) e no teste de germinação (G%) em sementes de crambe submetidas a quatro diferentes tratamentos.

CONCLUSÃO

Houve tendência de aumento da produção de sementes com aumento das doses de nitrogênio.

A qualidade fisiológica de sementes de crambe pode ser melhorada com a retirada do tegumento e a adição de GA_3.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. –. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

CARLSON, K. D.; GARDNER, J. C.; HANZEL, J. **Crambe: a new crop success.** New Crops: Alexandria, VA, 1996.

GUTORMSON, T.J.; LARSON, K.L.; WAQAR, T. Germination of freshly harvested and after-ripened crambe (Crambe abyssinica Hochst. EX. R.E. FRIES) seed. **Journal of Seed Technology**, v.16, n.1/2, 1992.

JASPER, S. P.; BIAGGIONI, M. A. M.; SILVA, P. R. A. Comparação do custo de produção do crambe (Crambe abyssinica Hochst) com outras culturas oleaginosas em sistema de plantio. **Revista Energia na Agricultura**, v. 25, n. 4, p. 141–153, 2010.

KNIGHTS, E.G. **Crambe: A North Dakota case study.** A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No. W02/005, Kingston, 2002. 25 p.

OLIVEIRA, R. L.; DIAS, L. A. S.; CORRÊA, T. R.; FERREIRA, P. H. S.; SILVA, M. F. Divergence and estimates of genetic parameters in Crambe abyssinica: an oilseed plant for industrial uses. **Revista Ceres**, v. 65, n.6, p. 500-506, 2018.

OPLINGER, E.S.; OELKE, E.A.; DOLL, J.D.; BUNDY, L.G.; SCHULER, R.T. 1989. **Flax chapter in Alternative Field Crops Manual.** University of Wisconsin Extension, University of Minnesota Center for Alternative Plant and Animal Products and University of Minnesota Extension.

PITOL, C.; BROCH, D. L.; ROSCOE, R. **Tecnologia e produção: crambe.** Maracaju: Fundação MS, 2010. 60 p.

SANTARÉM, E. R.; AQUILA, M. E. A. Influência de métodos de superação de dormência e do armazenamento na germinação de sementes de Senna macranthera (Colladon) Irwin ; Barneby (Leguminosae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.17, n.2, p.205 - 209, 1995.

SOUZA, L.G.M.; LAZARINI, E.; CAMARGO, F. P.; BOSSOLANI, J. W.; GARCIA, A. Componentes de produção e produtividade de crambe em função de doses de adubação nitrogenada em cobertura. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.10, n.19; p.523-531, 2014.

SOUZA, R. S. DE; CHAVES, L. H. G. Crescimento e produção do crambe submetido a doses de nitrogênio e fósforo. **Revista ESPACIOS**, v. 38, n. 8, p. 1–14, 2017.

SOUZA, A. D. V. de; FÁVORO, S. P.; ÍTAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão manso, nabo forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CÉSAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2009.

VECHIATTO C.D; FERNANDES, F.C.S. Aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do crambe. **Cultivando o Saber**, v.4, n.2, p.18-24, Cascavel, 2011.

ZOZ, T.; CASTAGNARA, D. D.; ZANOTTO, M. D.; PIVETTA, L. G.; GERHARDT, I. F. S.; SILVA, C. J.; TOPPA, E. V. B. Cultivo de crambe em diferentes espaçametos entre linhas e densidades populacionais. V Congresso Brasileiro de Mamona / II Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas & I Fórum Capixaba de Pinhão Manso. **Anais**...2012.

CAPÍTULO 12

SIMILARIDADES E DISSIMILARIDADES EM EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE JAMBU [*Acmella oleracea* (L.) R.K. JANSEN]

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 14/01/2021

Joyce da Costa Dias
Universidade Federal Rural da Amazônia
Belém, Pará
http://lattes.cnpq.br/1927002965362051

Mônica Trindade Abreu de Gusmão
Universidade Federal Rural da Amazônia
Belém, Pará
http://lattes.cnpq.br/4409997048754420

Camila Monteiro Salgado
Universidade Federal Rural da Amazônia
Belém, Pará
http://lattes.cnpq.br/5684833294876805

Leonel Rodrigues Souza
Universidade Federal Rural da Amazônia
Belém, Pará
http://lattes.cnpq.br/2410721343570674

RESUMO: O jambu [*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen] é uma hortaliça herbácea. Ocorre principalmente no norte do Brasil, sendo muito apreciada pela culinária paraense, devido haver em sua composição química o espilantol. Muitos estudos com jambu são voltados para análises ambientais ou morfológicas, sendo de suma importância analisar as divergências genéticas. Dessa forma, objetivou-se analisar as divergências genéticas entre cinco acessos de plântulas de jambu, baseado em medidas de dissimilaridades observadas no processo de emergência de plântulas no teste de germinação. As sementes de jambu, oriundas das seguintes regiões do estado do Pará: Tapanã, Cametá, Ponta de Pedra, Flor Roxa-Belém e Salvaterra, foram coletadas de inflorescências maduras. O experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado, com 5 tratamentos e 4 repetições. Os Gerboxs foram organizados ao acaso na câmara incubadora do tipo BOD. Os dados analisados foram processados e estimados no Rbio. A análise de dispersão constatou que a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, massa fresca foliar e comprimento da raiz são diretamente proporcionais e o IVG foi menor do que o tempo médio de germinação. Na análise do dendograma de dissimilaridade, a maior proximidade de grupos é composta pelos acessos das seguintes localidades: Salvaterra; Cametá; Ponta de Pedra e Tapanã, esse agrupamento apresentou maior distanciamento do acesso de Flor Roxa. Os resultados da análise de variância mostram que as variáveis de maior significância foram TMG, APA e MFF, rejeitando-se H0 a 5%. As médias resultantes dos parâmetros analisados foram altas com exceção da variável APA com valor abaixo da média, entretanto com relação CVg/CV tendente a 1 e herdabilidade acima de 69%. O acesso do grupo 1 (Flor Roxa) é indicado para cruzamentos com os acessos do grupo 2 (Salvaterra; Cametá; Ponta de Pedra e Tapanâ), sendo os acessos do grupo 2, similares entre si.

PALAVRAS - CHAVE: Hortaliça, Herdabilidade, Divergência Genética.

SIMILARITIES AND DISSIMILARITIES IN EMERGENCY OF JAMBU SEEDLINGS [*Acmella oleracea* (L.) R.K. JANSEN]

ABSTRACT: The jambu [Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen] is an herbaceous greenery. It occurs mainly in the north of Brazil, appreciated for the cuisine of Pará, because there is in its chemical composition spilantol. Many studies are focused on environmental analysis or morphological, being important to analyze the genetic divergences. Therefore, the objective was to analyze the genetic divergences between five accessions of jambu seedlings, based on measures of dissimilarities observed in the seedling emergence process in the germination test. Jambu seeds, from the following regions of the state of Pará: Tapanã, Cametá, Ponta de Pedra, Flor Roxa- Belém and Salvaterra, were collected from mature inflorescences. The experiment was executed in a completely randomized design, with five treatments and 4 repetitions. Gerboxs were randomly arranged in the BOD incubator chamber. The analyzed data were processed and estimated in Rbio. The dispersion analysis found that the germination percentage, germination speed index, fresh leaf mass and root length are directly proportional and the IVG was less than the average germination time. In the analysis of the dissimilarity dendogram, the greater proximity of the groups consists of accesses from the following locations: Salvaterra; Cameta; Ponta de Pedra and Tapanã, this group showed greater distance from the access of Flor Roxa. The results of the analysis of variance show that the most significant variables were TMG, APA and MFF, rejecting H0 at 5%. The mean resulting from the analyzed parameters were high except for the APA variable with a value below the average, but with a CVg / CV ratio tending to 1 and heritability above 69%. The access of group 1 (Flor Roxa) is indicated for crossings with the accesses of group 2 (Salvaterra; Cametá; Ponta de Pedra and Tapanâ), being the accesses of group 2, similar to each other.

KEYSWORDS: Greenery, Heritability, Genetic divergences.

1 | INTRODUÇÃO

O jambu [*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen] é uma hortaliça herbácea pertencente à família das Asteraceas, também conhecida por agrião-bravo, agrião-do-Pará, abecedária, botão-de-ouro e jambuaçú (RODRIGUES et al., 2014). Com ramos decumbentes que podem alcançar até 60 cm de comprimento. Ocorre principalmente no norte do Brasil, sendo muito apreciada pela culinária paraense, principal ingrediente de diversos pratos típicos, com sabor único e que proporciona sensação de dormência, devido haver em sua composição química o espilantol. Ademais, a hortaliça é rica em nutrientes como ferro, vitaminas B1, B2, niacina, vitamina C, vitamina A e cálcio, além de conter propriedades afrodisíacas, anti-inflamatórias, anestésicas sendo, portanto, uma matéria prima de grande potencial para indústria farmacêutica (GUSMÃO; GUSMÃO, 2013).

O estudo da biometria de sementes, frutos e da morfologia, juntamente com o desenvolvimento de plântulas, são base para as pesquisas sobre germinação e reprodução de mudas para recomposição vegetal (LEONHARDT et al., 2008; SOUZA, 2018). Compreender sobre germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas ajuda na

distinção e agrupamento de famílias botânicas diversas e até mesmo diferenciá-las em subfamílias, gêneros e espécies, colaborando nas pesquisas sobre tecnologia de sementes, regeneração, assim como dispersão, sucessão e regeneração da espécie (SANTOS et al., 2014).

Dessa forma, é possível compreender que muitos estudos com jambu são voltados para análises ambientais ou morfológicas, sendo de suma importância analisar as divergências genéticas fenotípicas e genotípicas para fins de melhoramento genético.

Neste sentido, segundo Cruz et al (2014) para obtenção de um excelente programa de melhoramento genético é necessário a formação de uma população base formada com alta variabilidade genética, para isso é indicado o intercruzamento entre cultivares com características relevantes e divergentes, formando, assim, híbridos de maior heterozigose, possibilitando que nas gerações segregantes haja obtenção de genótipos superiores.

Inicialmente é importante a escolha das matrizes que serão propagadas para, assim, haver a seleção. Nesse sentido, é recomendado que a seleção das matrizes tenha relação com variabilidade genética da característica de interesse, logo estimar a dissimilaridade genética entre as populações acelera o processo de seleção dos genótipos superiores (FERREIRA et al, 2003; SANTOS et al, 2018).

A reprodução sexuada é um importante aliado para o programa de melhoramento genético, devido proporcionar variabilidade genética suficiente para seleção de características relevantes, auxiliar na conservação dos recursos fitogênicos diversos e perpetuação de espécies em bancos de germoplasma (RUTHS et al.; 2019)

A identificação de possíveis genitores para cruzamento que apresentem heterogeneidade são analisados através de variadas técnicas biométricas que estimam medidas de dissimilaridade. Essa medida gera gráficos de dispersão que permite a análise da diversidade genética, identifica particularidades que mais colaboram para a diversidade genética dos indivíduos, além de agrupar os materiais com padrão de similaridade próximo (CRUZ, 2006; FISCHER, 2015).

Assim sendo, são fundamentais os estudos voltados para caracterização de espécies por meio da observação da emergência de plântulas, uma vez que viabiliza na detecção da variabilidade genética entre localidades distintas devido às condições ambientais dentro de populações de uma mesma espécie, além das suas variações individuais.

Dessa forma, objetivou-se analisar as divergências genéticas entre cinco acessos de plântulas de jambu, baseado em medidas de dissimilaridades observadas no processo de emergência de plântulas no teste de germinação.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, as sementes de jambu, oriundas das seguintes regiões do estado do Pará: Tapanã, Cametá, Ponta de Pedra, Flor Roxa- UFRA/Belém e Salvaterra, foram

coletadas de inflorescências maduras pertencentes ao Banco de Germoplasma do Setor de Hortaliças da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), no Campus de Belém (PA), situada no nordeste paraense, sob coordenadas 1°27'18''S e 48°30'9".

O material genético foi levado para o Laboratório de Sementes, para realizar os processos de debulha das sementes e separação das impurezas, seguida da deposição das sementes dentro das caixas de poliestireno Gerbox, com dimensões de 11 mm x 11 mm x 3,5 mm (Figura 1).

O experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com cinco tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos foram constituídos pelos cinco acessos: Tapanã, Cametá, Ponta de Pedra, Flor Roxa e Salvaterra. Cada repetição foi constituída por uma caixa de Gerbox contendo 100 sementes de jambu. Foram contabilizadas um total de 400 sementes por tratamento.

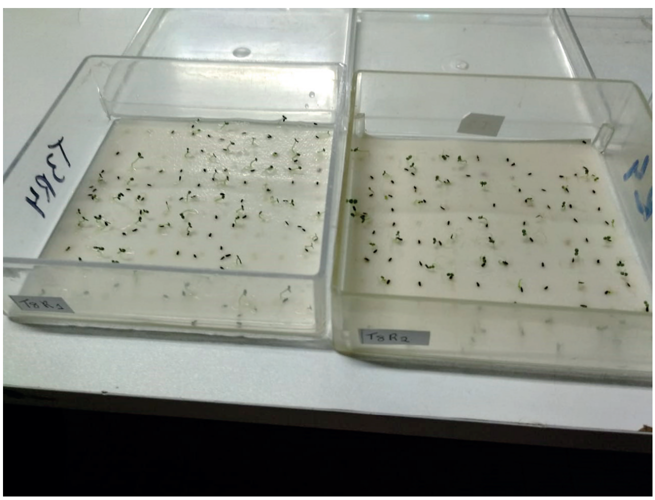


Figura 1 – Detalhe da disposição das sementes de plantas de jambu em caixas Gerbox.

Fonte: Autores

Utilizou-se folha de papel filtro como substrato, em todos os tratamentos. O substrato foi irrigado diariamente através de uma pipeta contendo 2 mL de água destilada, seguindo um padrão de umedecimento a cada 24 horas.

Os Gerboxs foram organizados ao acaso na câmara incubadora do tipo BOD (Figura 2), ambientando as sementes de jambu em temperatura de 29°C, com fotoperídodo de 12 horas e umidade relativa do ar em torno de 90°C, ao longo de oito dias.

Figura 2- Câmara BOD acondicionando os Gerbox com as sementes de jambu

Fonte: Autores

As análises diárias também auxiliaram na separação de sementes avaliadas como fungadas, moles e duras, sendo consideradas mortas, já que não apresentaram desenvolvimento ou quando apresentaram, estavam inviáveis ao uso comercial devido a presença de infecção por fungos.

Após oito dias de observação, todas as plântulas desenvolvidas foram pesadas em balança de precisão (Figura 3) para mensuração da massa fresca. Já para análise da massa seca o material genético foi colocado em estufa à 60ºC durante 48h, para ser aferida a massa após retirada da água.

Figura 3- Massa de plântula de jambu obtida em balança de precisão 0,001.

Fonte: Autores

Para obtenção da porcentagem de germinação, adotou-se expressão:

$$E = \left(\frac{\Sigma n}{ss}\right) x100$$

Em que: Σ: Somatória; n: número de sementes germinadas; ss: número de sementes na amostra.

Para obtenção do índice de velocidade de emergência, adotou-se a expressão:

$$\text{IVG} = \left(\frac{G1}{N1}\right) + \left(\frac{G2}{N2}\right) + \cdots \left(\frac{Gn}{Nn}\right)$$

Em que: G1, G2, Gn: Número de sementes germinadas na primeira, segunda e demais contagens. N1, N2, Nn: Número de dias após semeadura, sendo primeira, segunda e demais contagens.

Para obtenção do tempo médio de germinação, adotou-se a expressão:

$$TMG = \frac{\Sigma(\text{N1 x T1} + \text{N2 x T2} + \text{Nn x Tn})}{(\Sigma \text{N})}$$

Em que: Σ: Somatória; N1, N2, Nn: Número de sementes germinadas na primeira, segunda e demais contagens; T1, T2, Tn: Número de dias após semeadura, sendo primeira, segunda e demais contagens.

Para obtenção variância fenotípica adotou-se a expressão:

$$\sigma 2\text{f} = \frac{(QMT + QMR)}{r}$$

Em que: QMT: Quadrado médio do tratamento; QMR: Quadrado médio do tratamento; r: número de repetições

Para obtenção herdabilidade adotou-se a expressão:

$$\text{h2} = \frac{\sigma 2\text{g}}{\sigma 2\text{f}}$$

Em que: h2: Coeficiente de herdabilidade; σ^2g: Variância genotípica entre progênies; σ^2f: Variância fenotípica entre progênies.

Para obtenção coeficiente de variação genético adotou-se a expressão:

$$cvG = 100x \frac{(\sqrt{\Phi \text{g}})}{x}$$

Em que: Φg: Variação genética entre os tratamentos; $\overline{x}$: Média dos parâmetros morfológicos analisados.

Para obtenção Razão de variância genotípica e ambiental adotou-se a expressão=

$$\frac{\text{cvG}}{\text{cvE}}$$

Em que: cvG: Coeficiente de variação genética; cvE: Coeficiente de variação ambiental.

Para obtenção acurácia adotou-se a expressão:

$$Rgg = \frac{(r2mm\ x\ r2mq)}{1/2}$$

Em que: $r^2_{mm:}$ Confiabilidade global de predição; r^2_{mq}: Proporção da variação do gene explicada pelo marcador.

Os dados analisados foram processados e estimados no Rbio, *Software* livre de linguagem R, a fim de capturar informações relevantes ao interesse genético. Neste *Software* foram obtidas informações sobre parâmetros genéticos, dissimilaridade de acessos, qualidade de possível repetição dos dados com a anova, cargas fatoriais e componentes principais que mais apresentaram maior escore nos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de dispersão nos permite relacionar duas variáveis quantitativas, representadas pelo eixo X (coordenada) –porcentagem de germinação e eixo Y (abscissa) - velocidade de germinação, assim foi possível constatar que a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, massa fresca foliar e comprimento da raiz são diretamente proporcionais e o IVG foi menor do que o tempo médio de germinação (Gráfico 1). Isso pode ser explicado, pois segundo Nascimento et al, 2011; Sousa, (2018) o IVG é um medidor de vigor que estima em média quantas plantas germinaram por dia. Dessa forma, quanto maior a velocidade de germinação de uma plântula, menos exposta ela será aos infortúnios do meio, sendo diretamente refletido na produção final. Já a APA em comparação com o CR teve valores inferiores (Tabela 1), devido ter havido concentração de energia para o desenvolvimento da radícula, logo o TMG aumenta e a altura da parte aérea diminui, sendo importante ressaltar que as sementes duras e fungadas foram consideradas mortas, mesmo que tenham apresentado germinação, desenvolvimento de radícula e parte aérea. Em relação a MFF e MSF, obtiveram valores expressivos influenciados pelo tempo médio de germinação, onde os melhores resultados foram atribuídos à componente 1.

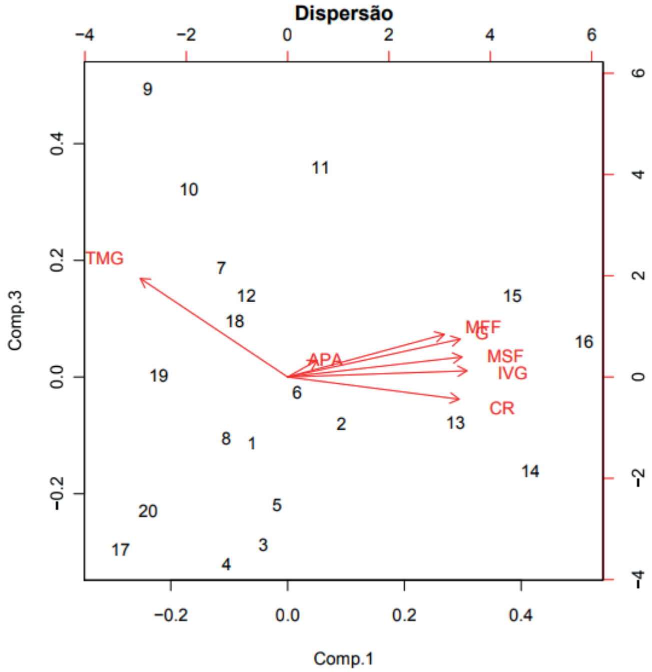


Gráfico1. Correlação da dispersão de componentes principais, sendo eixo de abscissas- Germinação e eixo de coordenadas- Índice de Velocidade de Germinação; G- porcentagem de germinação transformada em arc sen, IVE- Índice de Velocidade de Germinação TMG- Tempo Médio de Germinação, APA- Altura da Parte Aérea, CR- Comprimento de Radícula, MFF- Massa Fresca Foliar, MSF- Massa Seca Foliar. UFRA, Belém-PA, 2020.

Fonte: Autores, 2020.

	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4	Comp.5	Comp.6	Comp.7
G	0,420		0,318	0,181	0,541	0,268	0,566
IVE	0,436			0,109	0,361	0,141	-0,802
TME	-0,358	0,137	0,828	0,264	-0,213	0,156	-0,170
MFF	0,381		0,358	-0,811	-0,259		
MSF	0,424	0,161	0,168	0,301	-0,210	-0,793	
APA		-0,972	0,140	0,153			
CR	0,418		-0,186	0,339	-0,646	0,501	

Tabela 1. Estimativa de cargas fatoriais obtidas através de índices germinativos e biométricos. COMP.1- Altura da Parte Aérea, COMP.2- Comprimento de Radícula, COMP.3- Massa Fresca Foliar, COMP.4- Massa Seca Foliar, COMP.5- Porcentagem de Germinação, COMP.6- Índice de Velocidade de Germinação, COMP.7- Tempo Médio de Germinação, G- Porcentagem de Germinação IVG- Índice de Velocidade de Germinação, TMG- Tempo Médio de Germinação, APA- Altura da Parte Aérea, CR- Comprimento de Radícula, MFF- Massa Fresca Foliar, MSF- Massa Seca Foliar. UFRA, Belém-PA, 2020.

Fonte: Autores, 2020.

Na análise do dendograma de dissimilaridade de acessos de plântulas de jambu (Gráfico2), foram consideradas as variáveis de índice de velocidade de emergência; tempo médio de emergência; massa fresca foliar; massa seca foliar; altura da parte aérea e comprimento de radícula. Desta forma, foi possível observar dois diferentes grupos de acessos, com graus de proximidade e distanciamento entre si. Com isso, a maior proximidade de grupos é composta pelos acessos das seguintes localidades: Salvaterra (5); Cametá (2); Ponta de Pedra (3) e Tapanã (1). Esse agrupamento apresentou maior distanciamento do acesso de Flor Roxa (4), devido apresentarem características distintas. Segundo Rotili, (2012) e Santos (2018) os indivíduos com menor distanciamento gênico entre si, apresentam maior similaridade genética e poucas chances de reproduzir populações com alta heterose. Resultados semelhantes foram encontrados por Salgado et al, (2019) na análise do dendograma foi possível reunir três acessos de jambu em dois grupos, mostrando os materiais mais próximos e mais distantes geneticamente, assim foi possível concluir que entre os dois grupos há alta heterogeneidade, característica ideal para fins de melhoramento genético.

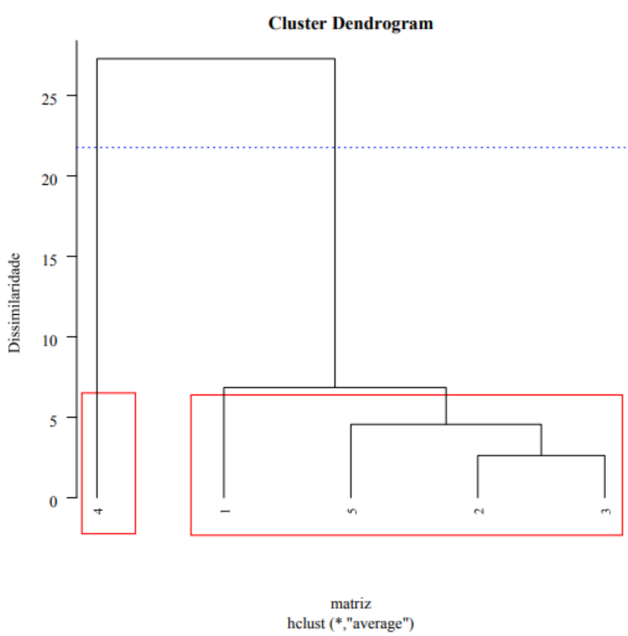


Gráfico 2. Dissimilaridade e agrupamento dos acessos de jambu com base nas variáveis germinativas e biométricas quantificadas. 1- Tapanã (TP), 2- Cametá (CT), 3- Ponta de Pedra (PP), 4- Flor Roxa (FR), 5- Salvaterra (SV). UFRA, Belém-PA, 2020.

Fonte: Autores, 2020.

Os resultados da análise de variância (Tabela 2) mostram que as variáveis de maior significância foram TMG, APA e MFF, rejeitando-se H0 a 5%, logo, apresentam diferença, dessa forma, demonstraram variabilidade quantitativa dos dados às características analisadas, rejeitando-se também a hipótese nula, ou seja, de que apresentem médias iguais, tendo em vista que os *p*-valores com significância a 1% também obtiveram resultados indesejáveis, com a probabilidade de serem iguais ser praticamente nula. Porém, os demais parâmetros apresentaram *p*-valores altos, indicando que os resultados são compatíveis com a hipótese nula, neste caso aceita-se Ho, e, dessa forma, apresentam proximidade entre si.

ANOVA					
Variáveis	SQT	SQR	QM	F-VALUE	Pr(>F)
G	0,6117	0,1032	0,35745	22,24	3,67e-06 ***
IVG	357,5	57,5	386,25	23,34	2,71e-06 ***
TMG	6,305	2,352	4,3285	10,05	0,000368 ***
APA	7,037	7,999	7,518	3,29	0,0397 *
CR	2206,3	68,3	1.137,3	121,2	3,14e-11 ***
MFF	0,0035	0,0034	0,00345	3,84	0,0241 *
MSF	0,0005983	0,0000362	3,1725	61,97	3,8e-09 ***

Tabela 2. Análise de ANOVA com significância a 5% de tukey; GTPAE, IVG- Índice de Velocidade de Germinação, TMG- Tempo Médio de Germinação, APA- Altura da Parte Aérea, CR- Comprimento de Radícula, MFF- Massa Fresca Foliar, MSF- Massa Seca Foliar; SQT- Soma do Quadrado de Tratamento; SQR- Soma do Quadrado Residual; QM- Quadrado Médio. Significad code *** ‘0’, ** ‘0,001’. UFRA, Belém-PA, 2020.

Fonte: Autores, 2020

As estimativas dos parâmetros genéticos dos diferentes acessos (Tabela 3) revelam que todos os acessos estão aptos para futuros programas de seleção, levando em consideração que os valores da relação CVg/CV tendentes a 1 ou maiores, apresentam genótipos onde nas características expressadas terá maior peso o valor gênico, com isso, no programa de seleção de genótipos o cruzamento de espécies com alto ganho de seleção denotará maior herdabilidade, a indica quanto do diferencial de seleção é devido ao ganho gênico. As médias resultantes dos parâmetros analisados foram altas com exceção da variável APA com valor abaixo da média, entretanto com relação CVg/CV tendente a 1 e herdabilidade acima de 69%. Segundo Resende (2015) a herdabilidade possui a seguinte

classificação, baixa ($0,01 \leq h^2 \leq 0,15$); média ($0,15 < h^2 \leq 0,50$); alta ($h^2 \geq 0,50$), como foi mostrado na Tabela 3, é possível observar que o número de genes é o maior responsável pela qualidade das características de germinação à temperatura de 29°C com fotoperíodo de 12h e umidade relativa do ar a 90%, condição comum no norte brasileiro. Assim como é exposto no trabalho de Salgados et al, (2019) a herdabilidade transparece a influência genotípica dos materiais, contabilizando a possibilidade das características de uma matriz ser repassada à próxima geração.

	PARÂMETROS							
Variáveis	CV(%)	CVf	CVg	CVe	σ2g(%)	CVg/CV	h²(%)	Rgg(%)
G	10,20	137,89	136,75	1,13765	24,35	5,48	99,17	99,58
IVG	19,04	22,34321	21,3857	0,9575091	45,01	2,36	95,71	97,83
TMG	7,19	0,3940472	0,3548501	0,03919712	10,82	1,50	90,05	94,89
APA	13,36	0,43979	0,30648	0,13331	10,13	0,75	69,68	83,47

Tabela 3. Estimativa de componentes de variância e parâmetros genéticos para variáveis do processo de germinação e variáveis biométricas. G- Porcentagem de germinação transformada em arc sen, IVG- Índice de Velocidade de Germinação, TMG- Tempo Médio de Germinação, APA- Altura da Parte Aérea, CR- Comprimento de Radícula, MFF- Massa Fresca Foliar, MSF- Massa Seca Foliar; CV- coeficiente de variação geral, CVf- variância fenotípica média, CVg- variância genotípica média, CVe- variância ambiental média, σ2g- coeficiente de variação genético, CVg/CV- razão genótipo/ambiente, h²- herdabilidade, Rgg- acurácia. UFRA, Belém-PA, 2020.

Fonte: Autores, 2020.

CONCLUSÃO

O acesso do grupo 1 (Flor Roxa) é indicado para cruzamentos com os acessos do grupo 2 (Salvaterra - 5; Cametá - 2; Ponta de Pedra - 3 e Tapanâ - 1), sendo os acessos do grupo 2, similares entre si.

REFERÊNCIAS

CRUZ, Cosme Damião. **Programa Genes - Análise Multivariada e Simulação**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. v. 1. 175 p.

CRUZ, Cosme Damião. **Programa GENES - Versão Windows. Aplicativo Computacional em Genética e Estatística**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. v. 1. 648 p.

FERREIRA, M.A.J.F. Correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente entre dez caracteres de melancia e suas implicações para o melhoramento genético. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, p.438-442, jul. / Set. 2003. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/hb/v21n3/17576.pdf. Acesso em: 10 novembro 2020.

FISCHER, Larissa; Análise multivariada da divergência genética da cultivar de mamoeiro rubi incaper 511. *In*: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica XIX, Encontro Latino Americano de Pós-Graduação XV e Encontro de Iniciação à Docência V; 2015 out. 22-23; São José dos Campos. **Anais** [...]. São José do Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2015. Tema Ciência, Luz e Tecnologias. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2015/anais/arquivos/0826_0481_01.pdf. Acesso em: 10 de novembro 2020.

GUSMÃO, Mônica; GUSMÃO, Sérgio. **Jambu da amazônia** (Acmella oleracea [(L.) R. K. Jansen]: **características gerais, cultivo convencional, orgânico e hidropônico**. 1º. Ed. São Paulo: Editora Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, 2013.

LEONHARDT, Cristina. Morfologia e desenvolvimento de plântulas de 29 espécies arbóreas nativas da área da Bacia Hidrográfica do Guaíba. **Iheringia Série Botânica**, Rio Grande do Sul. v. 63, n. 1, p. 5-14, jun/jul. 2007. Disponível em: http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20140328114458ih63_1_p005_014.pdf. Acesso em: 10 novembro 2020

NASCIMENTO, W. M. et al. **Qualidade fisiológica da semente e estabelecimento de plantas de hortaliças no campo.** In: XI Curso sobre tecnologia de produção de sementes de hortaliças. Porto Alegre/RS: Embrapa Hortaliças, 2011. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/911285/4/palestra17CursoSementesHortalicas11.pdf > Acesso em 10 novembro 2020.

RODRIGUES, D. S. *et al*. Influência da adubação com nitrogênio e fósforo na produção de jambu, Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 71-76, 2014. doi: 10.1590/S1516-05722014000100010. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n1/a10v16n1.pdf. Acesso em: 10 Novembro 2020.

ROTILI, Eliane Aparecida *et al*. Divergência genética em genótipos de milho, no estado do Tocantins. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 3, p. 516-521, jul-set, 2012. Doi: https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000300014. Disponível em: http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/1412/713. Acesso em: 10 novembro 2020.

RUTHS, Rodrigo, BONOME, Lisandro *et al* Influência da temperatura e luminosidade na germinação de sementes das espécies: Selenicereus setaceus, Hylocereus undatus e Hylocereus polyrhizus, **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Santa Catarina, v. 18, n. 2, p. 194–201, 2019. Doi: https://doi.org/10.5965/223811711812019194. Disponível em: https://periodicos.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/10891/pdf. Acesso em: 11 novembro 2020.

SOUSA, Erivanessa Costa. **Morfologia e germinação de sementes de jambu** (*Acmella oleracea* L. R. K. Jansen). Orientador: Salvador Barros Torres. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Rural do Semi árido, Mossoró, RN, 2018.

SANTOS, Luniara Bastos *et al*. Dissimilaridade genética entre famílias de melancia. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, Tocantins, v. 8, n. 1, p. 52-58, 2018 Doi: https://doi.org/10.21206/rbas.v8i1.480. Disponível em: https://periodicos.ufv.br/rbas/article/view/3019. Acesso em: 11 novembro. 2020.

SANTOS, Wender Ferreira dos *et al*. Diversidade genética em milho sob condições de restrição ao nitrogênio. **Journal of Bioenergy and Food Science**. Paraíba, v. 5, n. 2, p. 44-53, 2018. Doi: 10.18067/jbfs.v5i2.190. Disponível em : http://periodicos.ifap.edu.br/index.php/JBFS/article/view/190.

SALGADO, C.; GUSMÃO, M.; SANTOS, G.; DIAS, J. Índices de emergência de plântulas de *Acmella oleracea* (l.) R.k. jansen e *Acmella ciliata* (kunth) Cass. *In*: SIMPÓSIO DE ESTUDOS E PESQUISAS DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS NA AMAZÔNIA, VIII, 2019, Belém. **Anais** [...]. Belém: Universidade Estadual do Pará, 2019. p. 502-510.

CAPÍTULO 13

ZEBRAFISH MODEL IN THE STUDY OF HUMAN DISEASE

Data de aceite: 01/03/2021

Inês Dias
Politécnico de Coimbra, ESTeSC, DCBL, Coimbra, Coimbra, Portugal

Paulo Teixeira
Politécnico de Coimbra, ESTeSC, DCBL Coimbra, Coimbra, Portugal
University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Biophysics Institute of Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal;

Fernando Mendes
Politécnico de Coimbra, ESTeSC, DCBL, Coimbra, Coimbra, Portugal
University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Biophysics Institute of Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal;
University of Coimbra, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), Coimbra, Portugal;
Clinical Academic Center of Coimbra (CACC), Coimbra, Portugal.
European Association for Professions in Biomedical Science

Diana Martins
Politécnico de Coimbra, ESTeSC, DCBL Coimbra, Coimbra, Portugal
Clinical Academic Center of Coimbra (CACC), University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Biophysics Institute of Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal;
University of Coimbra, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB),

ABSTRACT: Research in biological sciences relies on the use of animal models to deepen knowledge related to causes and mechanisms of human pathologies, as well as the possibility for testing innovative therapies. Zebrafish (Danio rerio) is an experimental model in areas such as oncology, toxicology, genetics, reproductive studies and regenerative medicine. The relevance of this vertebrate model relies on the small size of these animals, easy to maintain and manipulate, with a high rate of reproduction and development. The genome, physiology and anatomical structure similar to humans allows the creation of transgenic or mutant models to study several human pathologies and consequently the discovery of new therapeutic targets. In this review, we explore the zebrafish model into the study of several human pathologies, highlighting neurodegenerative diseases, cancer development and progression, ocular diseases and kidney diseases.

KEYWORDS: Cancer; Danio Rerio; Eye Disorders; Kidney Disease, Neurological Disorders; In Vivo Animal model;

RESUMO: A pesquisa em ciências biológicas conta com a utilização de modelos animais para aprofundar conhecimentos relacionados às causas e mecanismos das patologias humanas, bem como a possibilidade de testar terapias inovadoras. O peixe-zebra (Danio rerio) é um

modelo experimental em áreas como oncologia, toxicologia, genética, estudos reprodutivos e medicina regenerativa. A relevância desse modelo de vertebrado está no pequeno porte desses animais, de fácil manutenção e manipulação, com alto índice de reprodução e desenvolvimento. O genoma, a fisiologia e a estrutura anatômica semelhantes aos humanos permitem a criação de modelos transgênicos ou mutantes para o estudo de diversas patologias humanas e consequentemente a descoberta de novos alvos terapêuticos. Nesta revisão, exploramos o modelo do peixe-zebra no estudo de várias patologias humanas, destacando doenças neurodegenerativas, desenvolvimento e progressão do câncer, doenças oculares e doenças renais.
PALAVRAS - CHAVE: Cancro; Danio Rerio; Desordens oculares; Doença Renal, Doenças Neurológicas; Modelo In Vivo Animal;

INTRODUCTION

Animal models have been an invaluable tool to advance biomedical sciences research as they provide experimental avenues for cellular and molecular investigation. The zebrafish (*Danio rerio*) is an excellent alternative to mammalian models used to apply powerful experimental methods normally used in invertebrates to answer questions about development and disease (1).

The zebrafish belongs to *Cyprinidae* family, is a slightly alkaline freshwater fish, having slow water as its preferred habitat *(1,2).* Due to the easy breeding and maintenance in the laboratory, the zebrafish has spread Worldwide, as an animal model. Studies involving this animal model grown exponentially and zebrafish model is now widely used. Methods and strategies for genetic and embryological evaluation and the induction of abnormal formative processes of internal organs can be easily applied to this model *(5)*.

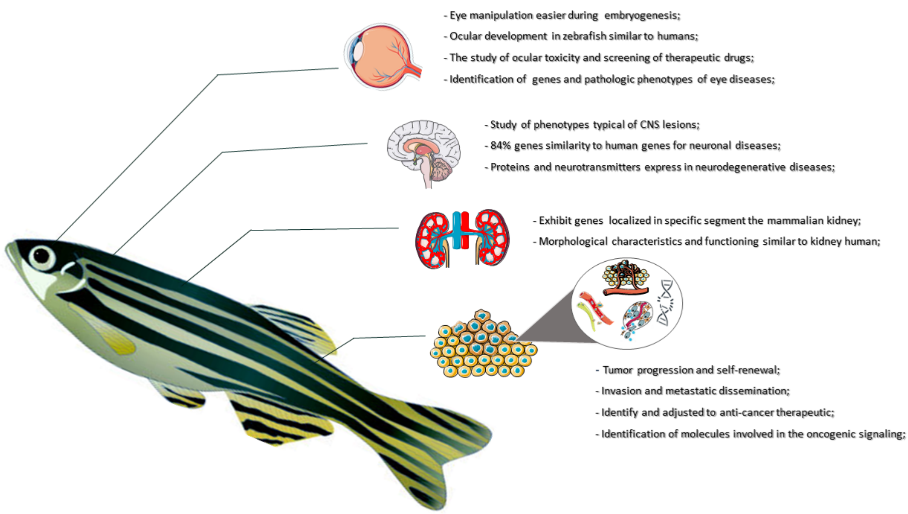
Until the beginning of its adult phase, zebrafish is transparent, which allows microscopic techniques that monitor cells *in vivo* through the different stages of its development *(1,6,7)*. This characteristic allows obtaining information regarding the animal's morphology, physiology and biochemistry *(1,6,8)*.

The zebrafish has a circulatory system, consisting of erythrocytes and platelets, which together with the operculum ensure gas exchange; a gastrointestinal system, composed of various organs such as intestine, liver, gallbladder, swimming bladder and pancreas *(1,9–12).* The immune system is ensured by macrocytes and leukocytes from hematopoietic stem cells in which the T lymphocytes have matured in the thymus (12).

Zebrafish is a very important animal model for biology and biomedicine, once it allows the study of many human diseases, with 70% of homology to human genes (6,13). Well-established transgenic zebrafish lines with fluorescence tissues are available and add new insights into cancer cell development, dissemination and the tumour microenvironment in real-time *(8)*.

Our aim with this review is to explore the zebrafish model in the study of several human pathologies, with a focus on neurodegenerative diseases, cancer, ocular and kidney

diseases (figure 1).



Zebrafish Model in Neurodegenerative Diseases

Zebrafish model represents an optimal model to study nervoussystemalterations due to the simplicity of its nervoussystem (15,16). Its central nervous system (CNS) is similarwith other vertebrates and just like mammals,the zebrafish brain contains several progenitor cells that generate new and distinct neuronal lines, havinga greater number of active neurogenic niches(10,17–20). The blood-brain barrier(BBB)is operational 3 days after fertilization, which offers an advantagecompared to higher vertebrates(21). Zebrafish still share 84% of the genes associated with human dementias, suchas:co-orthologues tomicrotubule-associated tau protein(MAPT) gene, protein amyloid-ß (APP) and presenilins (PSEN1and PSEN2)(15,22)but alsomany proteins and neurotransmitters expressed in neurodegenerativehumans diseases (15,18,23). These characteristics make zebrafish an enriching animal model to reproduce phenotypes typical of CNS lesions or human neurodegenerative diseases(19,20).

Alzheimer Disease studies in Zebrafish Model

Several studies in Alzheimer's disease (AD) have been developed through the zebrafish model, allowing the characterization of the disease and its evolution. Several behavioural trials were necessary to identify phenotypes like the disease in humans. Several researchers observe the learning and memorization capacity of Zebrafish through different stimuli, where cognitive and memory deficits were similar to those observed in humans, as well as mobility difficulties (15,20,24).

The induction of AD status in zebrafish was explored through different substances such as aluminium exposure and β 1-42 amyloid injection or okadaic acid (OKA) (20,24). Using the induction through the aluminium exposure, a reduction in cognitive and locomotor abilities was observed (20), whereas induction using amyloid β 1-42 leads to an increase in phosphorylation and a reduction in cognitive abilities (20,25–27).

From the development of these models, we were able to understand behavioral phenotypes associated with Alzheimer's disease that can be compared to humans, as well as through the method of action to develop drugs. For example, inducing using scopolamine, a drug able to induce a phenotype similar to AD, it was possible to track cholinesterase-inhibiting treatments, such as donepezil, which will block the breakdown of acetylcholine, increasing the amount of the neurotransmitter in the synapse and consequently increasing memory retention (15). Exposure to OKA is also capable of inducing phenotypes and alterations compatible with human AD-like pathology, and cases of cerebral amyloid angiopathy (CAA) are also verified. However, in zebrafish the use of OKA to induce AD has several limitations, since OKA is a protein phosphatase 2 (PP2A) and PP2A inhibitor presents in abundance throughout the zebrafish body, besides inducing neurotoxicity (19).

Techniques such as Microinjections of antisense morpholino oligonucleotides (MOs) were also used in the creation of AD zebrafish embryos. The use of MOs microinjections in zebrafish embryos has allowed the study of several genes associated with AD such as presenilin-1 (PSEN1, presenilin 2 (PSEN2), orthologue zebrafish amyloid precursor protein (Appa, and Appb) and their role in the pathophysiology of AD (15,22,25). The Appa and Appb genes are associated with CNS cell death, a mechanism that may be responsible for cognitive decline. Two homologues (Appa and Appb) have been identified in Zebrafish for the human amyloid protein precursor (APP) gene, through which the amyloid β is synthesized (13).

Currently, the zebrafish model has been explored for drug screening. Memantine has been used in zebrafish to assess neuroprotection, however, it has no effects on locomotor behavior (15,23–25). Methylene blue (MB) was studied in zebrafish as an inhibitor of aggregation, decreasing cognitive neurodegeneration and decline, however, the results have been in constant and even contradictory (15,22).

Parkinson's Disease in the Zebrafish Model

Zebrafish model has been widely explored in the study of Parkinson's Disease (PD), due to the genetic similarity to humans and also due to the dopaminergic neurons in zebrafish's posterior tuberculum are well characterized both in the embryonic and adulthood stages *(28–31)debilitating, neurodegenerative disorder for which the current gold standard treatment, levodopa (L-DOPA*.

Several studies identified in the zebrafish model, neurons containing tyrosine hydroxylase (TH) in the ventral diencephalon homologous to mammals *(25,32)* and DP-

related proteins such as Parkin (*PRKN),* protein Deglycase (DJ-1)*, Pten-induced kinase 1 (PINK1)* and leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2) (29,32).* PD can be studied in the zebrafish model through neurotoxins and genetic alterations. The neurotoxin-based models were developed through substances such as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 6-hydroxydopamine (6-OHDA), rotenone and paraquat *(28)*.

The creation of zebrafish models associated with PD, such as the 6-OHDA model, allows testing innovative drugs for PD. Through the zebrafish 6-OHDA model, neuroprotective drugs such as isradipine, rasagiline and minocycline were screened, and the results suggest that minocycline and rasagiline can protect or restore locomotor activity deficit and the loss of dopaminergic neurons due to 6-OHDA (28).

Studies with MPTP in zebrafish result in behavioral changes, including decreased locomotor activity associated with selective loss of dopaminergic neurons in the NHS, along with decreased levels of striatal dopamine. The main limitation of the MPTP model is the absence of formation of lascivious bodies (LB), one of the most important neuropathological characteristics of PD *(30,32)rodents, zebrafish, Caenorhabditis (C.*. In turn, using 6-OHDA in different regions of the brain, different phenotypes are observed in zebrafish according to the location of the substance, since it cannot cross the *BBB (17).*

The phenotypes produced by 6-OHDA in Zebrafish range from alterations of the axonal terminals, dopaminergic degeneration of neurons in the nigra substantia, decreased levels of dopamine and norepinephrine and motor deficiencies to olfactory disorders *(21,30,32).*

The 6-OHDA in Zebrafish also allowed the tracking of some therapeutic compounds such as antioxidants and iron chending agents that demonstrated optimistic effects on the neutralization of 6-OHDA neurotoxicity *(30)rodents, zebrafish, Caenorhabditis (C.* and therapies with vitamin E, minocycline and levodopa + carbidopa where recovery of locomotor deficiencies induced by 6-OHDA was verified *(21)*.

Pesticides such as paraquat,induce oxidative stress and cytotoxicity in neurons(21,30)leading todeficiencies in spatial memory, decrease in the proportion of 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)/dopamine levels, decrease in dopamine transporter expression,decrease inmitochondrial viability, andincrease in the expression of antioxidant enzymes(21). Some authors suggest the presence of locomotor alterations or anxiolytic and aggressive behaviours depending on the genotype and sex of the fish(21,33)However, when administrated inthe water, paraquat seems to induce no parkinsonian-like phenotypes in larvaeeand adult zebrafish(30).Inturn,studieswithrotenone induce inconstantphenotypes(21,30,31).

Through different genetic silencing techniques, such as MOs, Custered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeatsassociated protein 9(CRISPR/Cas9) several researchers studied in Zebrafish possible target therapies for genes associated with PD(21,25,30,32,34,35). One of the therapies tested in zebrafish for PD was L-3,4-

dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in which we verified a decrease in spontaneous swimming behaviour and a reduction in the expression of parkingenes, pink mRNA1 and TH protein (32).

Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Zebrafish Model

The zebrafish presents many features of Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), including decreased adult swimming endurance, loss of motor neurons, paralysis and larvael and adult neuromuscular junction defects (36–39). Currently, several studies have been developed in zebrafish to understand the aetiology of ALS, through microinjection of cDNA or mRNA (18,37,39,40) and techniques such as zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and CRISPR/Cas9 that allow easy testing in Zebrafish the loss or overexpression of genetic function associated with ALS (18,38). Most of these studies focused on genes such as TAR DNA Binding Protein (TARDBP), FUS RNA binding protein (FUS) and chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72) (36–38,40).

For example, ALS models generated by injection of cDNA or RNA in fertilized eggs allowed the creation of mutant SOD1 zebrafish models, associated with interneuron dysfunction. From the creation of SOD1 zebrafish mutant, it is possible to trace activating substances that regulate resistance to oxidative stress such as apomorphine and riluzole, where the neutralization of the interneuron dysfunction was observed (36).

With the development of transgenic zebrafish for ALS, it was possible to study neuronal toxicity associated with overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1). In zebrafish model, the SOD1 mutation demonstrated locomotor deficiency, paralysis, changes in nerve and muscle terminals, muscle atrophy, oxidative stress sensitivity and loss of motor neurons (37–39). Studies in Zebrafish using the TAR 43 protein (TDP-43) (34,36,37,39) suggested paralysis, neurodegeneration, oxidative stress in nerves and consequent deficiency of locomotion (18,23,37,38). The injection of human mutant FUS mRNA into Zebrafish resulted in the accumulation of cytosolic tension granules, aggregation of proteins in the cytoplasm of motor neurons, damage in the synaptic transmission of the neuromuscular junction, locomotor deficits and ventral root projection anomalies (18,36,37). From this model, it was possible to study the action of MB, pleiotropic molecule, used to prevent β amyloid and tau aggregation in vitro. MB in mutant zebrafish is effective in suppressing the TDP-43 and FUS phenotypes, protecting against cellular stress and conferring neuroprotective properties against the toxicity of TDP-43, a protein linked to the formation of amyotrophic sclerosis. The action of MB will reduce the stress of the endoplasmic reticulum resulting from the accumulation of mutant proteins and also restore synaptic function (22,34,38). Drugs such as guanabenz, phenanae and salubrinal were also tested in zebrafish with ALS and also revealed neuroprotective drugs (32,36).

A repeated expression of the hexanucleotide "GGGCC" in the non-coding region of the C9ORF72 gene was also studied in zebrafish associated with different forms of ALS such

as behavioural and cellular deficits related to locomotion and motor axonopathy (25,37–39).

Zebrafish Model in Neuropsychiatric diseases

The second class the neuronal diseases studied in zebrafish are Neuropsychiatric diseases. Within neuropsychiatric diseases, we can include Epilepsy, Autism Spectrum Disorder (ASD) and Schizophrenia (SCZ).

Epilepsy

In an epilepsy state, zebrafish presents similar behavior to human, from changes in locomotion, hyperactivity and spasms to electrical discharges in the CNS (18,22,25,41). Epilepsy studied in *larvael* and adult zebrafish through behavioural evaluation is possible through the administration of certain drugs and genetic alterations. The most commonly used drugs are picrotoxin, pentylenetetrazole (PTZ), kainic acid (KA) and acute caffeine (18,22,25). The behavioural alterations described were: hyperactivity, increased body cortisol, spasms in swimming, erratic movements, hyperventilation, fast whole-body clonic-like behaviour and even death (22,42). The zebrafish model was also evaluated as screening of therapeutics since these epilepsy-inducing drugs are suppressed by anti-epileptic drugs (22,25,43,44). For example, the creation of the PTZ model of adult zebrafish was crucial for the understanding and characterization of complex phenotypes of behavioural seizures, as well as in the investigation of molecular/cellular changes associated with seizure episodes.

Additionally, using the PTZ *larvael* model, it was possible to track therapeutic genes and identify modular seizure genes, using genetic lines (45). Other studies using Zebrafish have evaluated different anticonvulsant drugs and vitamin K analogues (44).

Techniques such as TALENs and CRISPR-Cas9 provide additional models for epilepsy research, creating stable genetic models targeting mutations of a single human epilepsy gene (46). Through CRISPR-Cas9 editing it was possible to create lines of zebrafish mutants with loss of functions for physiological comorbidities in syntaxin-binding protein 1 (STXBP1), aldehyde dehydrogenase 7 family member a1 (aldh7a1), among others (46). For example, the establishment of stable mutant lines for zebrafish STXBP1 homologues (stxbp1a and stxbp1b), characteristic of epilepsy, rebelled that zebrafish presents clinical phenotypes similar to those of the human syntaxin binding protein 1 mutation (47).

In recent decades, a model of epilepsy in zebrafish was also developed through the induction of N-Ethyl-N-nitrosourea (ENU), resulting in a phenotype similar to Dravet syndrome (41,43,48).

Autism Spectrum Disorder (ASD)

Zebrafish is a very social animal living in mixed-gender groups (shoals) with behavioural flexibility according to their social experience and a structured dominance

hierarchy (35,49). Zebrafish develops its social components during the first month of development, being visible at the 6th day after fertilization the first signs of shoal and later a rapid increase in the cohesion of the schoal. In less than a month after fertilization zebrafish already establishes social preferences associated with visual stimuli essential to their survival and schooling and other complex social interactions in the schoal (16,24,35,49,50).

The acquired behaviours are associated with the innate tendency of an animal to observe, mimic and approach a conspecific, characteristic preserved within the species of social vertebrates (35). To assess the emotional and social was used inhibitory prevention with cameras and paired with an aversive stimulus such as electric shock. In autism, aggression and even self-aggression behaviours are common due to the inability to process social suggestions. In zebrafish this component is observed in undulating, circular movements of the body, biting off the head, elevation of the fins, the opening of the mouth, pursuit of reflection and change of body colour. These behaviours were possible to identify through various tests with the use of mirrors (49).

The creation of zebrafish models to study ASD is possible through the disturbance of behavioural and cognitive function, by the action of drugs. For example, the use of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist (NMDA), which results in zebrafish in reducing the cohesion of the shoals and the exposure to nicotine which decreases the cohesion of the shoals but has a small effect on the polarization of the shoals (49).

The Zebrafish genome sequence bears high similarity to humans, with approximately 858 human genes associated with ASD being identified (49). Based on these similarities, several projects were developed based on the analysis of social behavior deficits. The ASD study, on a genetic level, was possible from the elimination of shank3b, the induction of the mutant ortholog Sam2 to the human gene *FAM19A2* and the study of the gene *centrosomal protein 41(CEP41)* (16,35,48). Using genome editing technologies such as CRISPR/Cas9-based genome editing it was possible to develop zebrafish gene lines allowing the study of phenotypes associated with ASD associated genetic variants. For example, using Cas9, it is possible to induce micro-dalicis in the ortholog of zebrafish (chd8) of the CDH8 gene of the human ASD, allowing to observe an overall increase in head size in fish, and thus mark the parallelize with the human phenotype (49). A CRISPR study also looked at risk genes for neuropsychic diseases such as schizophrenia and autism indicating significant behavioural changes in the mutants inner mitochondrial membrane peptidase subunit 2 (immp2l) and sodium channel, voltage-gated, type II, alpha (scn1lab) (35).

Schizophrenia (SCZ)

Schizophrenia is a debilitating disorder characterized by disorganized psychiatric thinking, disorientation, hallucinations, illusions and motivational decline (18,48,51). Schizophrenia is a genetically complex disease with the presence of more than one hundred variants and some quite rare and harmful. Through strategies such as the introduction of CRISPR/Cas9-mediated genome editing and other processes of suppression and

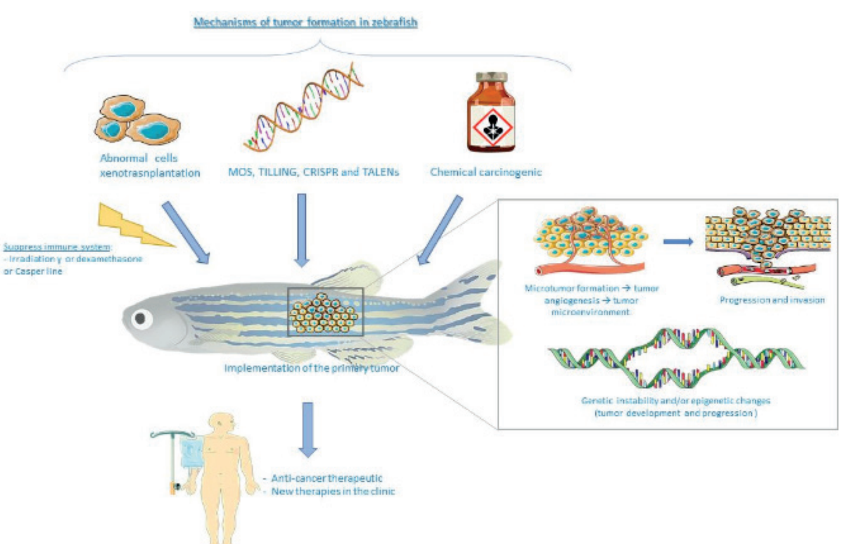
overexpression of genes easily established in the animal model, it was possible to create zebrafish models with genetic mutations or insertions directed to schizophrenia. The creation of these large-scale mutant models, due to the high fertility rate of zebrafish, allowed the study of phenotypes associated with the disease and also the screening of therapeutic potentials (25,48).

One of the applications of the mutant zebrafish model created from techniques such as CRISPR/Cas9, allowed to investigate the function of a rare gene associated with schizophrenia, the *disrupted in Schizophrenia 1(DISC1)(*17,48). Zebrafish disc1 mutants revealed an abnormal brain morphology in early stages of development, including changes in the small cerebral, hypothalamic ventricles, and stress responses in the zebrafish disc1 mutants. Changes in this gene have also been studied phenotypically where phenotypes common to schizophrenia, such as hyperlocomotion, social behaviour and memory deficits were observed (18,22,25,35,48).

Further study of dopaminergic and glutamatergic signalling will be crucial to understand the mechanisms involved in the neurological development aspects of schizophrenia (25).

Zebrafish Model in Oncology

Zebrafish model is nowadays a powerful tool to study tumoral process, from the implementation of the primary tumour to its development and development of metastases. Since the development of cancer spontaneously in zebrafish is rare, there is a need to induce tumour formation, through xenotransplantation of tumour cells, treatment with chemical exposure to carcinogenic or induction of genetic alterations and creation of mutant or transgenic models(8,52,53), as shown in Figure 2.



Zebrafish xenografts allow observation of changes in morphology, migration and cell cycle dynamics throughout tumour development. The xenotransplantation of tumour cells in zebrafish was developed in the phases of development, embryo, larvae and adult. The study in embryo and zebrafish larvae is very useful for its adaptive immune system and transparency. However, xenotransplantation in adult zebrafish allows a better analogy to human due to the tissue similarity between the mature tissues of zebrafish and the origin of xenograft. Currently, xenotransplantation in adult zebrafish is no longer compromised by the need to suppress the immune systems, through the use of techniques such as irradiation γ, treatment with dexamethasone and more recently a Casper line of transparent immunocompromised zebrafish, $prkdc^{fb103/fb103}$ $il2rga^{fb104/fb104}$ Casper-strain zebrafish (8,52,54,55). Zebrafish larvae and embryos may represent an interesting alternative to adult zebrafish because they allow the analysis of microtumor formation, tumour-induced angiogenesis and cell invasion. The study of tumour angiogenesis is also possible, due to its vascular embryonic system. Techniques such as fluorescence microscopy in transgenic embryos facilitate macroscopic and microscopic observation of the entire angiogenesis process (52–54,56).

Other studies on zebrafish have allowed tumour development and progression by creating genetic instability and/or epigenetic changes, a common feature in human tumours (52). Genetic instability in zebrafish is possible through reverse genetic approaches to generate loss-of-function phenotypes, such as MOs, targeting induced local lesions in genomes (TILLING), CRISPR/Ca9 system and transcription activator-like effector nucleases (TALENs) (8,53,56–58). The characterization of mutant and transgenic zebrafish lines allowed identifying chemical inhibitors of mutant phenotypes using chemical suppressor screens. For example, using a cell cycle stop mutant as a crash&burn (crb) it was possible to identify oncogenic genes (59). The zebrafish model has also been used in the study of tumour progression and self-renewal through cells in its microenvironment as called tumour-propagating cells (TPCS) which are responsible for initiating metastasis, relapse and stem cell-like population (52,53).

The complex and heterogeneous tumour development comprises interaction of multiple signalling pathways. The zebrafish model through chemical genetics has allowed the identification of molecules involved in the oncogenic signalling pathways and the discovery of new targeted therapies (8,59,60).

The zebrafish model allowed the development of small molecule screens, resulting from a procedure in which small molecules are tested for their ability to activate or modify a target or a biological process of interest. For example, inhibitors of oncogenic pathways including Wnt/b-catenin and Ras; metastasis of cancer including lymphamnesis and angiogenesis; and cell cycle aberrations were found (8,59). Regarding the study of tumour metastasis in Zebrafish, several tumours were studied, such as liver carcinoma, glioblastoma, breast cancer, rhabdomyosarcoma, melanoma, neuroblastoma, among

others(14,52,58). All the stages of the metastatic process were able to be studied including the beginning, approaching, clustering, invading, migrating, transmigrating and metastatic colonization (52,54,58,61). Several techniques are used to observe invasion and metastatic dissemination, such as the fluorescent zebrafish model and the development of transparent Casper adult zebrafish. For example, the fluorescent zebrafish model evaluates the progression of T-lymphoblastic lymphoma (T-LBL) to acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL) and the transparent Casper adult zebrafish to evaluate the graft and proliferation of pigmented melanoma cells (8,52,54,58,62).

Fluorescence transgenic zebrafish allow the detection of genes or alterations in the signaling pathways involved in tumor development, allowing the implementation of new therapies, through suppressive drugs, such as vascular endothelial growth factor (VEGFR) inhibitors, inhibition of SMYD3 (promotes cancer invasion), cell division cycle-associated protein 7 (CDCA7) and protein human MutT Homolog1 (MTH1) (54,63).

Due to their small size, zebrafish embryos and larvaee are ideal systems for large-scale screening of pharmacological molecules in culture plates and studies in vivo in cancer research, several molecules can be identified and adjusted to anti-cancer therapeutic strategies and drugs (59,62–64). Researchers studied chemical libraries variations based on the time and duration of exposure, chemical concentration and general toxicity. The most used are the *Chembridge DIVERSetE* collection of synthetic compounds and the LOPAC collection of bioactive (59). The zebrafish larvae and embryo has also been useful to identify specific therapies against cancer stem cells that contribute to metastasis and relapse (59,65). Currently, several drugs have been studied in zebrafish for various types of cancers such as *Dasatinib Quisinostat or Crizotinib* for Melanoma, Indenum[1,2-b]quinoxaline derivatives for hepatocellular carcinoma, Visfatin for breast cancer, among many others with significant results (54,66,67).

Zebrafish Model in Kidney diseases

Zebrafish is increasingly used in kidney diseases, as they are genetically tractable and have basic renal anatomy comparable to mammalian kidneys with tubular filtration processing and glomerular filtration (68–72). Genetic studies by Wingert et al. have confirmed that many genes that are localized to a specific segment in the mammalian kidney were also expressed in zebrafish prone, such as an expression chloride voltage-gated channel K gene (clcnk) associated chloride channel in mammals in the distal regions (68,70).

Given the morphological characteristics and functioning of the zebrafish kidneys, this animal model has been used in the study of several of these pathologies. About renal acute injury (AKI), Zebrafish has been used to study the effect of nephrotoxic agents such as gentamicin and cisplatin (70,72). The induction of AKI in zebrafish allowed to identify possible targets for nephrotic recovery therapy, with for example the analogue of 4-(phenylthio)-butanoic acid, which is an inhibitor of histone deactylase and is related to the reduction of

cell cycle arrest and consequently renal proliferation in the context of abrupt and protracted injury (72). Zebrafish ise also used in the study of glomerular diseases. Genome-associated studies (GWAS) identified phosphatase acid 1 (ACPI) and the SOS Ras/Rho guanine 2 nucleotide (SOS2), which were associated with renal function and development based on the estimated glomerular filtration rate (eGFR) (70). Genetic studies revealed several mutations associated with renal filtration and cell growth (70).

With the use of transgenic zebrafish, it was possible to identify several mutations associated with kidney diseases, such as underlying mutations in the FAT atypi-calcadherin1 gene (FAT1) in inoculant in steroid-resistant nephrotic syndrome (SSR) and also a specific transgenic line of podocyte Tg (podocin:GFP) (70–72). Polycystic kidney disease and cylopathy were also studied in this model, where it was possible to identify 12 genes causing human cystic kidney disease in a panel of zebrafish mutants with cystic phenotypes (70–73). Some scientists studied the relation between renal disease and apolipoprotein 1 (APOL), suggesting that zebrafish model is beneficial in the study of APOL eliminating the potential redundancy effect because zebrafish have only one APOL orthologue and the primates are up to five APOL genes (70). The screening and testing of drugs through the zebrafish model, is now possible, by the knowledge of the renal physiology of zebrafish and by laboratory procedures such as genetic screens that allow the breeding and detection of a mutant organism (70,72).

Zebrafish Model in Ocular diseases

Ocular development in zebrafish is like humans and other vertebrates. Zebrafish has predominantly cone-mediated vision like the human macula resulting in color vision with a cone density close to humans. The retina in zebrafish and humans also share the same layout, with the ganglion cell layer, the outer nuclear layer, the inner nuclear layer and two synaptic layers. Moreover, the retinal architecture is characterized by photoreceptor subtypes spatially arranged in a highly organized photoreceptor mosaic. Besides, the eyes of the zebrafish are large relative to the overall size of the fish, allowing eye manipulation easier during embryogenesis (74).

The characteristics mentioned above, and the great genetic homology enable a widespread investigation of human ocular diseases in this vertebrate model (75). Several researchers search for genetic modifications in Zebrafish. They have identified genome editing technologies, such as TALENs, MOs, the clustered regularly interspersed short palindromic repeats CRISPR-/Cas 9 system and zinc-finger nucleases (ZFNs) (74–76). The MO knockdown technique allowed the identification of genes associated with Joubert syndrome (JBTS). The JBTS is a type of human diseases associated with numerous ciliopathic defects, ataxia, cognitive impairment and retinopathy (75,77). ZFNs have been extensively studied in DNA manipulation, allowed to induce gene expression in zebrafish for further mechanistic studies of eye phenotypes. The use of ZFNs allowed the study of

hereditary mutations and somatic mutations. Using ZFNs it was possible to create clarin 1 (clrn1 gene) mutants, associated with syndrome type III, which leads to progressive loss of vision in patients (75,78). From 2011, several studies were developed using TALENs, which can be more easily designed than ZFNs. With the use of TALENs it was possible to establish a link between eye diseases and target genes, such as elongation Factor Tu GTP Binding Domain Containing 2 (EFTUD2 *gene), beta 3-glucosyltransferase (B3GLCT gene), mab-21 like 2 (MAB21L2 gene), abelson helper integration site 1 (AHI1) and paired like homeodomain 2 (PITX2 gene) (75,79*–81).

Currently, studies have been conducted on the modeling of human eye diseases with CRISPR/Cas9 system in zebrafish (75,82). Using CRISPR-Cas9 it was possible to establish a line of zebrafish with elimination of the mutation in the frame in the chaperonin containing TCP1 Subunit 2 (cct2 gene). As heterozygous mutations composed in CCT2, result in symptoms such as sunken eyes, early-onset blindness, photophobia and oculodigital signs, well characteristic of Leber Congenital Amaurosis (LCA). Through the retina of the homozygous mutant, we can associate cct2 with the significant death of the cell in the developing neural retina, a phenotype similar to that of retinal pathology in human patients of LCA (75,83). Associated with each phenotype of eye disease, these zebrafish genes homologous to humans were identified through zebrafish mutant/morphant establishment. For example, associated with Coloboma we identified mutant adenomatomas polyposis coli (apc) homologous to the human gene APC and associated with Corneal dystrophies and cataract we identified laminin α1 (Lama1), homologous to the human LAMA1 gene(74).

The Microphthalmia was studied in zebrafish identifying genes such as SRY (sex-determining region Y)-box 2 (SOX2 gene), the gene most associated with this disease, and the patched 1 (PTCH1) gene. Using CRISPR/Cas9- mediated knockout zebrafish, it was possible to identify the characteristic phenotype of patients as defects of the terminal nerve and ethmoid plate and decreased eye size (74,75). In Arhinia Microphthalmia Syndrome, we used CRISPR/Cas9 edited smchd1 knockout zebrafish in which phenotypes such as ethmoid plate defects, eye size and terminal nerve were observed (75). Mutant zebrafish models were used in the study of ocular coloboma, allowing to understand the optic fissure morphogenesis and orthologues of the human ocular coloboma, characteristic of retinal and lens defects. The creation of mutant zebrafish models allowed to better understand ocular coloboma. For example, homozygous mutant zebrafish for the paired box gene 2 (pax2) mutation is associated with a defect in the closure of optic fissure and recessive mutations in genes such as laminin-γ1 (lamc1), laminin-β1 (lamb1a), growth factor and growth differentiation 6 (gdf6a), adenomatous polyposis coli (apc), patched1 (ptc1) and n-cadherin (ncad). These mutations were associated with pathological changes in the extracellular matrix position compromising tissue function and persistence of optic fissure (74,75). In retinal degeneration, a model expressed a human RHO transgene with a truncated mutation Q344X, associated with the autosomal dominant form of the disease and the pde6c zebrafish

mutant, that cause changes in zebrafish vision (84).

However, many other studies in pathologies such as Glaucoma (74,80), Cyclopia (74), Corneal dystrophies (74), Cataract (74,85), Ocular albinism (74), retinitis pigmentosa (74,84), genetic correlations and pathologic phenotypes were also identified (74). The Zebrafish model is used in the study of ocular toxicity and screening of therapeutic drugs for eye diseases. Unlike other animal models, Zebrafish has an unusual characteristic, the retina can regenerate (74,86).

CONCLUSION

The study of the anatomical structure and metabolism of the zebrafish model revealed an intimate connection with the human, suggesting that this model is desirable for the study of various human pathologies. Although zebrafish do not spontaneously develop diseases similar to humans, their genetic and behavioral homology allows the induction of the pathological state. The establishment of genetic screens and the easy manipulation of the genome allows basic and transactional investigation of cell biology and pathogenesis. This animal model proved important in the identification, testing of inhibitors, and genetic or chemical suppressors associated with phenotypes of different diseases. The transparency of the embryo and zebrafish larvae make this model unique for the direct visualization of cellular dynamics, allowing a better understanding of the development and progression of complex diseases such as cancer and neurodegenerative diseases. In recent years, the zebrafish model has proven satisfactory results regarding the diagnosis and prognosis of human diseases, as well as in the discovery of new therapies. Being a low-cost model, comparing with other models used widely, shares a high genetic similarity with the human, high fecundity and easy chemical absorption makes zebrafish a powerful model in the screening of new drugs and therapies directed to human diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS:

All authors have read and approved this manuscript in line with the journal's authorship agreement and policy on disclosure of potential conflicts of interest. The authors declare no conflicts of interest.

DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist

REFERENCES

1. Dooley K. Zebrafish: a model system for the study of human disease. Curr Opin Genet Dev. 2000;

2. Bird NC, Mabee PM. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, Danio rerio (Ostariophysi: Cyprinidae). Dev Dyn. 2003;

3. LI H-H, HUANG P, DONG W, ZHU Z-Y, LIU D. A brief history of zebrafish research-toward biomedicine. Hered. 2013;

4. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio). Nature. 1981;

5. Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. Nat Rev Genet. 2002;

6. Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. J Clin Invest. 2012;

7. Bryson-Richardson RJ, Berger S, Schilling TF, Hall TE, Cole NJ, Gibson AJ, et al. FishNet: an online database of zebrafish anatomy. BMC Biol. 2007;

8. Hason, Bartůněk. Zebrafish Models of Cancer—New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. Genes (Basel). 2019;

9. Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The Vascular Anatomy of the Developing Zebrafish: An Atlas of Embryonic and Early Larvael Development. Dev Biol. 2001;

10. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn. 1995;

11. Lu J-W, Ho Y-J, Ciou S-C, Gong Z. Innovative Disease Model: Zebrafish as an In Vivo Platform for Intestinal Disorder and Tumors. Biomedicines. 2017;

12. Gore A V., Pillay LM, Venero Galanternik M, Weinstein BM. The zebrafish: A fintastic model for hematopoietic development and disease. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2018;

13. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 2013;

14. Brown HK, Schiavone K, Tazzyman S, Heymann D, Chico TJA. Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery. Expert Opin Drug Discov. 2017;

15. Caramillo EM, Echevarria DJ. Alzheimer's disease in the zebrafish. Behav Pharmacol. 2017;

16. Kozol R. Prenatal Neuropathologies in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability: The Gestation of a Comprehensive Zebrafish Model. J Dev Biol. 2018;

17. Kozol RA, Abrams AJ, James DM, Buglo E, Yan Q, Dallman JE. Function Over Form: Modeling Groups of Inherited Neurological Conditions in Zebrafish. Front Mol Neurosci. 2016;

18. Pitchai A, Rajaretinam RK, Freeman JL. Zebrafish as an Emerging Model for Bioassay-Guided Natural Product Drug Discovery for Neurological Disorders. Medicines. 2019;

19. Zambusi A, Ninkovic J. Regeneration of the central nervous system-principles from brain regeneration in adult zebrafish. World J Stem Cells. 2020;

20. Koehler D, Williams F. Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. Neural Regen Res. 2018;

21. Vaz RL, Outeiro TF, Ferreira JJ. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. Front Neurol. 2018;

22. Khan KM, Collier AD, Meshalkina DA, Kysil E V., Khatsko SL, Kolesnikova T, et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. Br J Pharmacol. 2017;

23. de Araújo Boleti AP, de Oliveira Flores TM, Moreno SE, Anjos L dos, Mortari MR, Migliolo L. Neuroinflammation: An overview of neurodegenerative and metabolic diseases and of biotechnological studies. Neurochem Int. 2020;

24. Meshalkina DA, Kizlyk MN, Kysil E V., Collier AD, Echevarria DJ, Abreu MS, et al. Understanding zebrafish cognition. Behav Processes. 2017;

25. Fontana BD, Mezzomo NJ, Kalueff A V., Rosemberg DB. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. Exp Neurol. 2018;

26. Bhattarai P, Thomas AK, Cosacak MI, Papadimitriou C, Mashkaryan V, Zhang Y, et al. Modeling Amyloid-β42 TToxicity and Neurodegeneration in Adult Zebrafish Brain. J Vis Exp. 2017;

27. Cosacak MI, Bhattarai P, Reinhardt S, Petzold A, Dahl A, Zhang Y, et al. Single-Cell Transcriptomics Analyses of Neural Stem Cell Heterogeneity and Contextual Plasticity in a Zebrafish Brain Model of Amyloid Toxicity. Cell Rep. 2019;

28. Cronin A, Grealy M. Neuroprotective and Neuro-restorative Effects of Minocycline and Rasagiline in a Zebrafish 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. Neuroscience. 2017;

29. Matsui H, Takahashi R. Parkinson's disease pathogenesis from the viewpoint of small fish models. J Neural Transm. 2018;

30. Chia SJ, Tan E-K, Chao Y-X. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2020;

31. Zeng X-S, Geng W-S, Jia J-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. ASN Neuro. 2018;

32. Ünal İ, Emekli-Alturfan E. Fishing for Parkinson's Disease: A review of the literature. J Clin Neurosci. 2019;

33. Nunes ME, Müller TE, Braga MM, Fontana BD, Quadros VA, Marins A, et al. Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. Mol Neurobiol. 2017;

34. Martín-Jiménez R, Campanella M, Russell C. New Zebrafish Models of Neurodegeneration. Curr Neurol Neurosci Rep. 2015;

35. Geng Y, Peterson RT. The zebrafish subcortical social brain as a model for studying social behavior disorders. Dis Model Mech. 2019;

36. Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. Dis Model Mech. 2017;

37. Gois AM, Mendonça DMF, Freire MAM, Santos JR. In vitro and in vivo models of amyotrophic lateral sclerosis: an updated overview. Brain Res Bull. 2020;

38. Patten SA, Parker JA, Wen X-Y, Drapeau P. Simple animal models for amyotrophic lateral sclerosis drug discovery. Expert Opin Drug Discov. 2016;

39. Morrice J, Gregory-Evans C, Shaw C. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity. Neural Regen Res. 2018;

40. Patten SA, Aggad D, Martinez J, Tremblay E, Petrillo J, Armstrong GA, et al. Neuroleptics as therapeutic compounds stabilizing neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. JCI Insight. 2017;

41. Griffin A, Krasniak C, Baraban SC. Advancing epilepsy treatment through personalized genetic zebrafish models. In: Progress in Brain Research. Elsevier B.V.; 2016.

42. Torres-Hernández BA, Colón LR, Rosa-Falero C, Torrado A, Miscalichi N, Ortíz JG, et al. Reversal of pentylenetetrazole-altered swimming and neural activity-regulated gene expression in zebrafish larvaee by valproic acid and valerian extract. Psychopharmacology (Berl). 2016;

43. Griffin A, Hamling KR, Hong SG, Anvar M, Lee LP, Baraban SC. Preclinical animal models for Dravet syndrome: Seizure phenotypes, comorbidities and drug screening. Vol. 9, Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.; 2018.

44. Cunliffe VT. Building a zebrafish toolkit for investigating the pathobiology of epilepsy and identifying new treatments for epileptic seizures. J Neurosci Methods. 2016;

45. Gawel K, Langlois M, Martins T, van der Ent W, Tiraboschi E, Jacmin M, et al. Seizing the moment: Zebrafish epilepsy models. Neurosci Biobehav Rev. 2020;

46. Burrows DRW, Samarut É, Liu J, Baraban SC, Richardson MP, Meyer MP, et al. Imaging epilepsy in larvael zebrafish. Eur J Paediatr Neurol. 2020;

47. Grone BP, Marchese M, Hamling KR, Kumar MG, Krasniak CS, Sicca F, et al. Epilepsy, Behavioral Abnormalities, and Physiological Comorbidities in Syntaxin-Binding Protein 1 (STXBP1) Mutant Zebrafish. PLoS One. 2016;

48. Sakai C, Ijaz S, Hoffman EJ. Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Past, Present, and Future. Front Mol Neurosci. 2018;

49. Meshalkina DA, N. Kizlyk M, V. Kysil E, Collier AD, Echevarria DJ, Abreu MS, et al. Zebrafish models of autism spectrum disorder. Exp Neurol. 2018;

50. Abril-de-Abreu R, Cruz J, Oliveira RF. Social Eavesdropping in Zebrafish: Tuning of Attention to Social Interactions. Sci Rep. 2015;

51. Campbell PD, Granato M. Zebrafish as a tool to study schizophrenia-associated copy number variants. Dis Model Mech. 2020;

52. Moore JC, Langenau DM. Allograft Cancer Cell Transplantation in Zebrafish. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York LLC; 2016.

53. Zhang B, Xuan C, Ji Y, Zhang W, Wang D. Zebrafish xenotransplantation as a tool for in vivo cancer study. Fam Cancer. 2015;

54. Xiao J, Glasgow E, Agarwal S. Zebrafish Xenografts for Drug Discovery and Personalized Medicine. Trends in Cancer. 2020;

55. GUO M, WEI H, HU J, SUN S, LONG J, WANG X. U0126 inhibits pancreatic cancer progression via the KRAS signaling pathway in a zebrafish xenotransplantation model. Oncol Rep. 2015;

56. Gaudenzi G, Carra S, Dicitore A, Cantone MC, Persani L, Vitale G. Fishing for neuroendocrine tumors. Endocr Relat Cancer. 2020;

57. Bootorabi F, Manouchehri H, Changizi R, Barker H, Palazzo E, Saltari A, et al. Zebrafish as a Model Organism for the Development of Drugs for Skin Cancer. Int J Mol Sci. 2017;

58. Zhao S, Huang J, Ye J. A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. J Exp Clin Cancer Res. 2015;

59. Dang M, Fogley R, Zon LI. Identifying Novel Cancer Therapies Using Chemical Genetics and Zebrafish. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York LLC; 2016.

60. Wrighton PJ, Oderberg IM, Goessling W. There Is Something Fishy About Liver Cancer: Zebrafish Models of Hepatocellular Carcinoma. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2019;

61. Nakayama J, Makinoshima H. Zebrafish-Based Screening Models for the Identification of Anti-Metastatic Drugs. Molecules. 2020;

62. Xie X, Ross JL, Cowell JK, Teng Y. The promise of zebrafish as a chemical screening tool in cancer therapy. Future Med Chem. 2015;

63. Wiley DS, Redfield SE, Zon LI. Chemical screening in zebrafish for novel biological and therapeutic discovery. In: Methods in Cell Biology. Academic Press Inc.; 2017.

64. Lam P-Y, Peterson RT. Developing zebrafish disease models for in vivo small molecule screens. Curr Opin Chem Biol. 2019;

65. Wertman J, Veinotte CJ, Dellaire G, Berman JN. The Zebrafish Xenograft Platform: Evolution of a Novel Cancer Model and Preclinical Screening Tool. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York LLC; 2016.

66. van der Ent W, Burrello C, de Lange MJ, van der Velden PA, Jochemsen AG, Jager MJ, et al. Embryonic Zebrafish: Different Phenotypes after Injection of Human Uveal Melanoma Cells. Ocul Oncol Pathol. 2015;

67. Hung AC, Lo S, Hou M-F, Lee Y-C, Tsai C-H, Chen Y-Y, et al. Extracellular Visfatin-Promoted Malignant Behavior in Breast Cancer Is Mediated Through c-Abl and STAT3 Activation. Clin Cancer Res. 2016;

68. Kersten S, Arjona FJ. Ion transport in the zebrafish kidney from a human disease angle: possibilities, considerations, and future perspectives. Am J Physiol Physiol. 2017;

69. Capelson M, Hetzer MW. Kidney Development and Disease. Molecular Biology. Cham; 2017.

70. Outtandy P, Russell C, Kleta R, Bockenhauer D. Zebrafish as a model for kidney function and disease. Pediatr Nephrol. 2019;

71. Morales EE, Wingert RA. Zebrafish as a Model of Kidney Disease. In: Results and Problems in Cell Differentiation. Springer Verlag; 2017.

72. Poureetezadi SJ, Wingert RA. Little fish, big catch: zebrafish as a model for kidney disease. Kidney Int. 2016;

73. Schenk H, Müller-Deile J, Kinast M, Schiffer M. Disease modeling in genetic kidney diseases: zebrafish. Cell Tissue Res. 2017;

74. Richardson R, Tracey-White D, Webster A, Moosajee M. The zebrafish eye—a paradigm for investigating human ocular genetics. Eye. 2017;

75. Zheng S-S, Han R-Y, Xiang L, Zhuang Y-Y, Jin Z-B. Versatile Genome Engineering Techniques Advance Human Ocular Disease Researches in Zebrafish. Front Cell Dev Biol. 2018;

76. Lewis TR, Kundinger SR, Pavlovich AL, Bostrom JR, Link BA, Besharse JC. Cos2/Kif7 and Osm-3/Kif17 regulate onset of outer segment development in zebrafish photoreceptors through distinct mechanisms. Dev Biol. 2017;

77. Elsayed SM, Phillips JB, Heller R, Thoenes M, Elsobky E, Nürnberg G, et al. Non-manifesting AHI1 truncations indicate localized loss-of-function tolerance in a severe Mendelian disease gene. Hum Mol Genet. 2015;

78. Gopal SR, Chen DH-C, Chou S-W, Zang J, Neuhauss SCF, Stepanyan R, et al. Zebrafish Models for the Mechanosensory Hair Cell Dysfunction in Usher Syndrome 3 Reveal That Clarin-1 Is an Essential Hair Bundle Protein. J Neurosci. 2015;

79. Lessieur EM, Fogerty J, Gaivin RJ, Song P, Perkins BD. The Ciliopathy Gene ahi1 Is Required for Zebrafish Cone Photoreceptor Outer Segment Morphogenesis and Survival. Investig Opthalmology Vis Sci. 2017;

80. Hendee KE, Sorokina EA, Muheisen SS, Reis LM, Tyler RC, Markovic V, et al. PITX2 deficiency and associated human disease: insights from the zebrafish model. Hum Mol Genet. 2018;

81. Deml B, Reis LM, Muheisen S, Bick D, Semina E V. EFTUD2 deficiency in vertebrates: Identification of a novel human mutation and generation of a zebrafish model. Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol. 2015;

82. Chassaing N, Davis EE, McKnight KL, Niederriter AR, Causse A, David V, et al. Targeted resequencing identifies PTCH1 as a major contributor to ocular developmental anomalies and extends the SOX2 regulatory network. Genome Res. 2016;

83. Minegishi Y, Nakaya N, Tomarev SI. Mutation in the Zebrafish cct2 Gene Leads to Abnormalities of Cell Cycle and Cell Death in the Retina: A Model of CCT2 -Related Leber Congenital Amaurosis. Investig Opthalmology Vis Sci. 2018;

84. Ganzen L, Venkatraman P, Pang C, Leung Y, Zhang M. Utilizing Zebrafish Visual Behaviors in Drug Screening for Retinal Degeneration. Int J Mol Sci. 2017;

85. Huang X-F, Xiang L, Cheng W, Cheng F-F, He K-W, Zhang B-W, et al. Mutation of IPO13 causes recessive ocular coloboma, microphthalmia, and cataract. Exp Mol Med. 2018;

86. Cassar S, Adatto I, Freeman JL, Gamse JT, Iturria I, Lawrence C, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. Chem Res Toxicol. 2020;

CAPÍTULO 14

ASSOCIAÇÃO RARA DAS SÍNDROMES XYY E DELEÇÃO DO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 18 EM UM RECÉM-NASCIDO: RELATO DE CASO

Data de aceite: 01/03/2021
Data de submissão: 05/02/2021

Marta Marques de Carvalho Lopes
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/5757240118652494

Rejane Alves de Carvalho Monteiro
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/9507045978246174

Isabela Aurora Rodrigues
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/1684736955046581

Juliana Gonçalves de Araújo Fernandes
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte – MG
http://lattes.cnpq.br/0371367022511217

Isabelly Rocha Borges
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/7327544257936451

Luana Marcelina Silva Pereira
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte – MG
http://lattes.cnpq.br/1310824026373730

Edynara Rocha Araújo
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte – MG
http://lattes.cnpq.br/3726124214630777

Uyara da Silva Cadar
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/8779541079514672

Ruth Cop Ferreira
Associação Santamarense de Beneficência do Guarujá-Hospital Santo Amaro
Guarujá - SP
http://lattes.cnpq.br/7901736527868999

RESUMO: Relatamos os achados clínicos e citogenéticos de um recém- nascido (RN) apresentando uma associação de síndromes genéticas raras caracterizadas por um cromossomo Y adicional e uma deleção do braço curto do cromossomo 18, cariótipo 47,XYY,del(18)(p11.1), sem precedentes na literatura. Ao nascimento, foi evidenciada genitália ambígua, ânus impérvio e uma fistula abaixo do que seria o óstio da uretra. Ao exame clínico detalhado, não foram visualizadas outras alterações fenotípicas. Até os 7 meses de vida, a criança não apresentou atrasos no desenvolvimento neuropsicomotor condizentes com as alterações citogenéticas encontradas. A descrição clínica e laboratorial de pacientes apresentando síndromes raras é de suma importância, visto que as mesmas apresentam um amplo espectro clínico e a

avaliação dessas alterações genéticas possibilita uma correlação fenótipo e genótipo indispensável para uma maior acuidade no aconselhamento genético, além do entendimento da doença e melhores estratégias terapêuticas.
PALAVRAS - CHAVE: síndromes genéticas raras, citogenética convencional, estratégias terapêuticas.

ASSOCIATION OF XYY SYNDROMES AND DELETION OF THE SHORT ARM OF CHROMOSOME 18 IN A NEWBORN: CASE REPORT

ABSTRACT: We report the clinical and cytogenetic findings in a newborn who has an association of rare genetic syndromes characterized by an additional Y chromosome and a deletion of the short arm of chromosome 18, karyotype 47,XYY,del(18)(p11.1), never described in the scientific literature. At birth, were evidenced ambiguous genitalia, impervious anus and a fistula below what would be the urethral ostium. Upon detailed clinical examination, other phenotypic changes were not seen. Up to 7 months of age, the child didn't show delays in neuropsychomotor development consistent with the cytogenetic changes found. The clinical and laboratory description of patients with rare syndromes is very important, since it shows a broad clinical spectrum and the evaluation of these genetic alterations allows a correlation between phenotype and genotype, which is essential for greater accuracy in genetic counseling, in addition to the study of the disease and better therapeutic strategies.
KEYWORDS: rare genetic syndromes, conventional cytogenetics, therapeutic strategies.

1 | INTRODUÇÃO

Durante o processo de formação dos gametas, a estabilidade cromossômica numérica e estrutural é de fundamental importância para que o desenvolvimento embrionário aconteça de maneira correta. Qualquer alteração neste padrão acarretará em um desbalanço na expressão gênica, gerando um concepto fenotipicamente anormal ou inviável. As aneuploidias são alterações numéricas caracterizadas pela presença de um número de cromossomos não múltiplos exatos do conjunto haploide, constituindo a anomalia cromossômica mais prevalente em humanos. A presença de cópias extras dos cromossomos sexuais é mais frequente em comparação aos cromossomos autossômicos, visto que os mesmos apresentam uma maior susceptibilidade a erros durante a meiose, principalmente na meiose paterna, onde os cromossomos sexuais X e Y pareiam-se apenas pelas regiões pseudoautossômicas, apresentando assim uma maior instabilidade sináptica. Além disto, cópias extras de cromossomos autossômicos são em grande maioria deletérias, sendo apenas algumas compatíveis com a vida (MALUF *et al.*, 2011).

Já as alterações cromossômicas estruturais podem ser classificadas em balanceadas, isto é, sem ganho ou perda de material genético, ou não balanceadas, com ganho ou perda de fragmento cromossômico. A deleção é um exemplo de alteração estrutural desbalanceada, onde uma porção é perdida em um dos braços do cromossomo, levando a uma monossomia parcial do mesmo (MALUF *et al.*, 2011).

A síndrome XYY, conhecida como duplo Y, apresenta uma frequência de 1:1000 nativivos do sexo masculino e ocorre devido a um erro no estágio II da meiose na espermatogênese ou em decorrência de uma falha durante o processo de divisão celular na mitose pós-zigótica, de forma que alguns espermatozoides são constituídos por dois cromossomos sexuais Y. Homens com essa síndrome raramente apresentam malformações congênitas, a maioria é diagnosticada tardiamente devido às graves alterações comportamentais, como déficit de atenção, hiperatividade e autismo. Fenotipicamente, podem apresentar alta estatura, hipotonia muscular, anormalidades neurológicas, entre outras (JACOBS *et al*., 1965; MBAMOGNOUA *et al*., 2020).

A síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 18 (OMIM #146390) foi o primeiro exemplo de monossomia autossômica parcial descrita com maior sobrevida. Sua incidência estimada é de 1:50.000 nascidos vivos, sendo mais frequente em mulheres, considerada rara, principalmente em indivíduos do sexo masculino. As manifestações clínicas desta síndrome são diversas, variando de acordo com o tamanho do fragmento perdido e genes envolvidos, sendo o atraso no crescimento e desenvolvimento cognitivo, baixa estatura e alterações craniofaciais, as mais comuns. A maioria dos casos envolvendo a deleção do braço curto do cromossomo 18 (18p-) é causada por deleções espontâneas (*de novo*), os demais decorrem da formação de anéis cromossômicos e de rearranjos cromossômicos desequilibrados (MARANDA *et al*., 2006; QI *et al*., 2019).

A investigação de pacientes com alterações cromossômicas raras é de extrema relevância, pois possibilita uma melhor compreensão clínica e prognóstica. Portanto, o relato de caso de um recém-nascido (RN) com o cariótipo 47,XYY,del(18)(p11.1) trará muitas contribuições para a comunidade científica, considerando a ausência de relatos de associação das duas síndromes em um mesmo indivíduo semelhantes na literatura.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa iniciou-se a partir da realização do exame de cariótipo de banda G do RN pelo Departamento de Citogenética do Instituto Hermes Pardini. A realização do exame possibilitou o diagnóstico do paciente, através da análise dos cromossomos pela técnica de bandeamento G padrão (DRETS, M.E., & SHAW, M.W., 1971). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando a utilização do resultado, assim como o histórico clínico e laboratorial e quaisquer outras informações relevantes para o uso em pesquisa e/ou divulgação científica foi assinado pela responsável pelo paciente.

Posteriormente, foi feita uma revisão bibliográfica nos bancos de dados públicos disponíveis (PubMed, MedLine), incluindo estudos sobre as síndromes em questão.

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

Trata-se de um RN, primeiro filho de casal hígido, não consanguíneos e sem histórico

familiar de malformações congênitas. A mãe apresentava 40 anos de idade, GII PII, A0. Nega histórico de intercorrências durante o período pré-natal. Ainda sem conhecimento da gestação foi submetida a um tratamento psiquiátrico com a medicação Paroxetina 20mg, 1 comprimido à noite, interrompendo o uso logo após a descoberta da gravidez, aos dois meses (aproximadamente com 8 semanas de idade gestacional). Nega exposição a outros agentes teratogênicos. O pai, com 49 anos de idade, possui duas filhas gêmeas, hígidas, de 29 anos, provenientes de sua primeira união.

A criança nasceu de parto cesáreo, a termo (39 semanas), pesando 3.320g, estatura de 49 cm, perímetro cefálico de 36 cm e apgar 9/10/10. Ao nascimento, foi evidenciada genitália ambígua (presença de grandes lábios e clitóris proeminentes ou pênis e bolsa escrotal não fundida) e ânus impérvio. Ao exame clinico detalhado, foi visualizada a presença de uma fístula abaixo do que seria o óstio da uretra com saída de mecônio, sem outras alterações morfológicas ao exame físico.

Durante a triagem neonatal, foi realizada a manobra de ortolani, com resultado negativo, teste reflexo vermelho, teste do pezinho e triagem auditiva, ambos sem alterações. Na unidade de terapia intensiva neonatal, realizou ultrassonografias dos rins e vias urinárias, evidenciando hidronefrose bilateral grau 1 e da pelve com a presença dos testículos em região inguinal, bilateral e epidídimos correspondentes. Além de raio-X do abdômen com ausência de ar em ampola retal e perfil com reto terminando na região da fístula e do tórax sem alterações. O ecocardiograma apresentou forame oval patente (normal para a idade). Devido à sepse neonatal, a colostomia não fora realizada de imediato, a alternativa encontrada pela equipe cirúrgica foi dilatação da fístula, com saída de grande quantidade de mecônio, melhorando imediatamente a distensão abdominal. Realizada colostomia com 11 dias de vida, sem intercorrências. Em nenhum momento necessitou de suporte ventilatório. Foi realizada a dosagem de 17-Alfa-Hidroxiprogesterona, apresentando resultado normal, descartando assim a hipótese de hiperplasia adrenal congênita. Por fim, foi feito o cariótipo por banda G, revelando o resultado 47,XYY,del(18)(p11.1) (Figura 1). Recebeu alta em seio materno após 17 dias de internação.

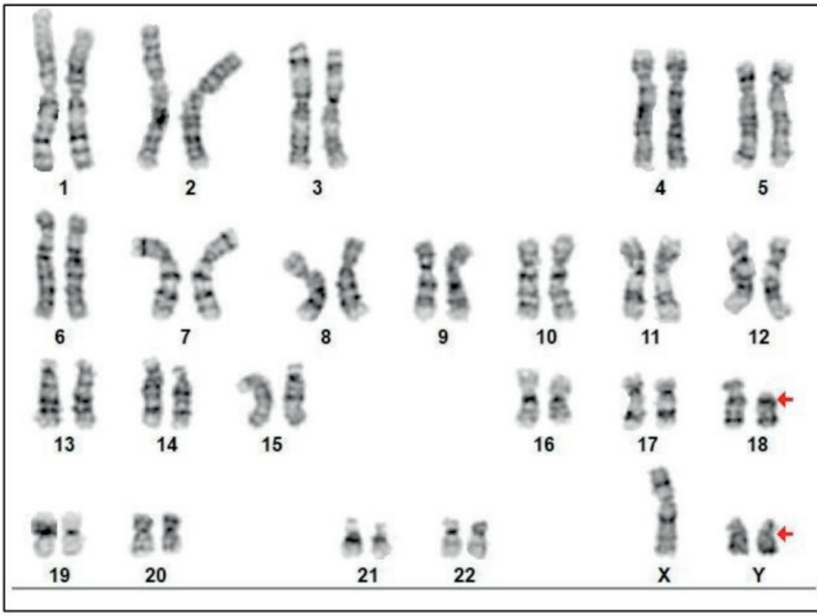


Figura 1: Cariótipo Banda G- 450 Bandas.

Resultado: 47,XYY,del(18)(p11.1), setas indicam os cromossomos alterados.

Fonte: Banco de dados do Departamento de Citogenética do Instituto Hermes Pardini.

Ao completar um mês de vida, o bebê realizou um raio-X da coluna lombar apresentando corpos vertebrais de forma, estrutura e contornos normais, pedículos e espaços intervertebrais conservados. Aos quatro meses de vida, foi realizado o exame ecocardiografia transtorácica color doppler apresentando todas as medidas ecográficas normais e valvas sem alterações, sem evidências de cardiopatia com repercussão hemodinâmica atual. A dosagem do hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante, cortisol basal e T4 livre, também foram normais.

A ultrassonografia do aparelho urinário foi repetida após seis meses do nascimento, mostrando os rins com forma, contorno, dimensões, topografia e eixos normais, parênquima conservado e diferenciado em sinusial e córtico-medular bilateralmente, ou seja, sem a presença de hidronefrose bilateral. Foi realizada também a ultrassonografia craniana, apresentando resultado normal.

Na última consulta de rotina ao pediatra, realizada em fevereiro/2021, aos 7 meses de vida, não foram observados atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Suas medidas antropométricas (estatura de 63 cm, 44 cm de perímetro cefálico e peso 5.740 g) estão dentro do escore esperado pela Organização Mundial da Saúde (2006) (GARZA 2006), embora o ganho de peso não tenha sido o ideal. Uma equipe multidisciplinar o acompanha

constantemente.

A Paroxetina, também conhecida como Cloridrato de Paroxetina, é um medicamento antidepressivo da classe dos inibidores seletivos de receptação da serotonina (SSRI). Até meados de 2005, era considerada uma droga segura durante o período pré-natal, posteriormente, a farmacêutica GlaxoSmithKline (GSK) publicou em seu site que a utilização do referido medicamento no primeiro trimestre de gravidez seria um fator de risco para malformações congênitas, em especial as cardiopatias, mudando assim a sua classificação de risco para Categoria D na gestação (GlaxoSmithKline, 2005). Desde então, vários estudos em diversas populações foram feitos com a finalidade de avaliar a teratogenicidade da droga. Os resultados obtidos foram conflitantes em relação às malformações maiores, mas em relação às malformações cardíacas, foram significantes (BÉRARD *et al.,* 2016; EINARSON, 2010). Sendo assim, considerando as malformações cardíacas o achado clínico de maior relevância ao uso da Paroxetina no primeiro trimestre de gravidez, pode-se inferir que as malformações encontradas no concepto podem não estar relacionadas ao uso do medicamento, indicando maior relevância às alterações citogenéticas encontradas.

As malformações genito-urinárias apresentadas pelo RN podem estar associadas à deleção 18p. A criptorquidia, anomalia urogenital mais comum, está mapeada na região 18p11.32p11.31. Nesta região, estão presentes os genes *TGIF1*, *THOC1* E *CETN1,* ligados ao desenvolvimento deste sistema (tabela 1). A deleção do gene *TGIF1* está relacionada à holoprosencefalia (HPE) e suas microformas, cerca de 10 a 15% dos indivíduos com 18p- manifestam a doença (WANG *et al.,* 2009; TATSI *et al.,* 2013; HASI-ZOGAJ *et al.,* 2015). Tatsi *et al. (*2013) demonstraram que a além da HPE, alterações na expressão gênica de *TGIF1* estão envolvidos na síndrome de interrupção da haste hipofisária, que normalmente manifestam-se na infância com hipoglicemia, falhas no crescimento devido às deficiências dos hormônios hipofisários e micropênis. A haploinsuficiência gênica de *THOC1* e *CETN1* pode estar ligada ao desenvolvimento anormal testicular. Já o gene *TXNDC2* localizado em 18p11.22*,* responsável pela expressão proteica da tiorredoxina nos testículos, envolvida nos estágios finais da espermatogênese, pode cursar em infertilidade (Tabela 1) (JIMENEZ *et al.,* 2002; WANG *et al.,* 2009; HASI-ZOGAJ *et al.,* 2015).

Gene	Localização	Efeitos Haploinsuficiência	Referência
TGIF1	18p11.31	HPE; Síndrome de interrupção da haste hipofisária	Tatsi *et al.*, 2013
THOC1	18p11.32	Desenvolvimento testicular anormal	Wang *et al.*, 2009; Hasi-Zogaj *et al.*, 2015
CETN1	18p11.32	Desenvolvimento testicular anormal	Wang *et al.*, 2009; Hasi-Zogaj *et al.*, 2015
TXNDC2	18p11.22	Infertilidade	Jimenez *et al.*, 2002

Tabela 1- Efeitos da Haploinsuficiência dos genes relacionados às malformações genito-urinárias mapeados no cromossomo 18p.

A presença do cromossomo Y adicional também pode ter corroborado para a existência de genitália ambígua no recém-nascido, embora malformações em indivíduos 47,XYY seja rara. Mbamognoua e colaboradores (2020), relataram o caso de um jovem com 17 anos de idade, com cariótipo 47,XYY, que ao exame clínico foi constatado micropênis, ginecomastia bilateral estágio II sem secreção mamilar, testículos com 3,5 cm e pelos pubianos, ambos no estágio de Tanner II. A relação testosterona/DHT (diidrotestosterona plasmática) foi avaliada, o resultado encontrado foi maior que 20 (=29), permitindo assim concluir a deficiência da enzima 5-alfa redutase. Tal enzima é responsável pela catalisação da testosterona em di-hidrotestosterona, hormônio primordial no processo de diferenciação da genitália externa e do trato urogenital masculino. A deficiência de 5-alfa redutase é considerada uma doença rara, cursando em um pseudo-hermafroditismo masculino. A deficiência enzimática foi possivelmente explicada pela duplicidade do cromossomo Y, contudo, em indivíduos XYY com função gonadotrópica normal, esta hipótese não seria aceita (MBAMOGNOUA *et al.,* 2020).

A malformação anorretal também pode estar associada à 18p-, embora ainda não haja genes específicos descritos nesta região que poderiam estar modulando para esta anomalia, esta malformação está associada às regiões consideradas como críticas em 18p, onde a dosagem gênica ainda não foi estabelecida. Essas regiões críticas já foram relacionadas a variados fenótipos, tais como, anomalias estruturais da hipófise, deficiência auditiva, tetralogia de Fallot, doenças autoimunes, criptorquidia, agenesia sacral, estrabismo, displasia de quadril, entre outros (HASI-ZOGAJ *et al.,* 2015).

Indivíduos portadores da deleção de 18p apresentam um amplo espectro de fenótipos, algumas manifestações clínicas iniciam no período pré-natal e muitas outras após o nascimento. A grande heterogeneidade genética da região em hemizigose poderia

explicar tais variações, pois muitos genes que compõem a região 18p quando em cópia única causam fenótipos de baixa penetrância (SEBOLD *et al.,* 2015).

4 I CONCLUSÃO

O referido estudo descreveu a associação de duas síndromes raras em um mesmo indivíduo, sem precedentes na literatura. Os resultados da pesquisa evidenciaram que ambas as alterações genéticas possivelmente afetaram o fenótipo do paciente.

A descrição clínica e laboratorial de pacientes apresentando síndromes raras é de suma importância, visto que as mesmas apresentam um amplo espectro clínico e a avaliação dessas alterações genéticas possibilita uma correlação fenótipo e genótipo indispensável para uma maior acuidade no aconselhamento genético, além do entendimento da doença e melhores estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

BÉRARD, A. *et al.* **The risk of major cardiac malformations associated with paroxetine use during the first trimester of pregnancy: a systematic review and meta-analysis. British Journal of Clinical Pharmacology, v. 81, n. 4, p. 589-604, 2016.**

DRETS, M. E., & SHAW, M. W. "**Specific banding patterns of human chromosomes.**" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America v. 68, 1971.

EINARSON, A. **Paroxetine use in pregnancy and increased risk of heart defects: Evaluating the evidence**. *Canadian Family Physician, v. 56, n. 8, p. 767-768, 2010.*

Garza C. **New growth standards for the 21st century: a prescriptive approach.** Nutr Rev. 2006 May;64(5 Pt 2):S55-9; discussion S72-91.

GlaxoSmithKline. **Use of paroxetine in first trimester of pregnancy may have a small increased risk of birth defects, compared to other antidepressants.** Mississauga, ON: GlaxoSmithKline; 2005. Oct, 2005.

HASI-ZOGAJ, M. *et al.* **A review of 18p deletions.** American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, v. 169, p. 251-264, 2015.

JACOBS, P. A. *et al.* **Aggressive behavior, mental sub-normality and the XYY male.** Nature, v. 208, n. 5017, p. 1351-1352, 1965.

JIMENEZ, A. *et al.* **Human spermatid-specific thioredoxin-1 (Sptrx-1) is a two-domain protein with oxidizing activity.** FEBS Letters, v. 530, p. 79-84, 2002.

MALUF, S.W. *et al.* **Citogenética Humana.** 1º ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 334 p.

MARANDA, B. *et al.* **Familial deletion 18p syndrome: case report.** BMC Medical Genetics, v. 7, n. 60, p. 1-6, 2006.

MBAMOGNOUA, N. G. A. *et al.* **Association between karyotype 47XYY and 5-alpha reductase deficiency revealed by micropenis: about a case and literature review.** The Pan African Medical Journal, v. 36, n. 48, p. 1-7, 2020.

QI, H. *et al*. **Prenatal diagnosis of de novo monosomy 18p deletion syndrome by chromosome microarray analysis.** Medicine, v. 98 n. 14, p. 1-5, 2019.

SEBOLD, C. *et al*. **Whole arm deletions of 18p: medical and developmental effects.** American Journal of Medical Genetics Part A, v. 167A, p. 313-323, 2015.

TATSI, C**.** *et al.* **Pituitary stalk interruption syndrome and isolated pituitary hypoplasia may be caused by mutations in holoprosencephaly-related genes.** The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 98, n. 4, p. 779-784, 2013.

WANG, X. *et al*. **Thoc1 deficiency compromises gene expression necessary for normal testis development in the mouse.** Molecular and Cellular Biology, v. 29, p. 2794-2803, 2009.

CAPÍTULO 15

SÍNDROME DE DELEÇÃO 18p COMO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA BAIXA ESTATURA: RELATO DE CASO

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 05/02/2021

Rejane Alves de Carvalho Monteiro
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte – MG
http://lattes.cnpq.br/9507045978246174

Marta Marques de Carvalho Lopes
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/5757240118652494

Isabela Aurora Rodrigues
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/1684736955046581

Juliana Gonçalves de Araújo Fernandes
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte – MG
http://lattes.cnpq.br/0371367022511217

Isabelly Rocha Borges
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/7327544257936451

Luana Marcelina Silva Pereira
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte – MG
http://lattes.cnpq.br/1310824026373730

Uyara da Silva Cadar
Departamento Citogenética do Instituto Hermes Pardini
Belo Horizonte - MG
http://lattes.cnpq.br/8779541079514672

Raquel Tavares Boy da Silva
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Faculdade de Ciências Médicas
Rio de Janeiro – RJ
http://lattes.cnpq.br/2452352599100610

RESUMO: A síndrome de deleção do braço curto do cromossomo 18 é uma alteração rara, com espectro clínico amplo, variando de acordo com o tamanho do segmento perdido e número de genes envolvidos. As principais características desta síndrome são baixa estatura e alterações craniofaciais. Neste artigo, apresentamos uma menina de dois anos encaminhada ao setor de citogenética do Instituto Hermes Pardini, com déficit de crescimento pós-natal e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor. Aos 10 meses, foram evidenciadas dismorfias craniofaciais e encurtamento de membros, com idade óssea aos 15 meses equivalente a 3 meses de vida. O resultado do seu cariótipo foi 46,XX,del(18)(p11.2), envolvendo a deleção de aproximadamente 66 genes (OMIM), onde alguns deles apresentam funções que poderiam estar modulando o fenótipo relatado. Como a baixa estatura é um dos principais achados clínicos frequentemente descritos associados à síndrome 18p-, sugerimos que essa deleção seja incluída no diagnóstico diferencial de crianças que apresentam este fenótipo. O exame

citogenético por bandamento G é de suma importância no diagnóstico destes pacientes, tanto para identificar este tipo de alteração cromossômica, como para o aconselhamento genético familiar.
PALAVRAS - CHAVE: Baixa estatura**,** síndrome de deleção 18p, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, citogenética.

18p DELETION SYNDROME AS A DIFFERENTIAL DIAGNOSIS FOR LOW STATURE: CASE REPORT

ABSTRACT: The short arm deletion syndrome of chromosome 18 is a rare disorder, with a broad clinical spectrum, varying according to the size of the lost segment and the number of genes involved. The main characteristics of this syndrome are short stature and craniofacial changes. In this article, we present a two years old girl referred to the cytogenetics sector of the Hermes Pardini Institute, with postnatal growth deficit and delayed neuropsychomotor development. At 10 months, craniofacial dysmorphia and limb shortening were evidenced, with bone age at 15 months old equivalent to 3 months old. The result of her karyotype was 46,XX,del(18)(p11.2), involving the deletion of approximately 66 genes (OMIM), where some of them have functions that could be modulating the reported phenotype. As short stature is one of the main clinical findings frequently described in association with 18p- syndrome, we suggest that this deletion be included in the differential diagnosis of children with this phenotype. Cytogenetic examination by G banding is very important in the diagnosis of these patients, both to identify this type of chromosomal alteration for the family genetic counseling.
KEYWORDS: Short stature, 18p deletion syndrome, neuropsychomotor developmental delay, cytogenetic.

1 I INTRODUÇÃO

As anomalias cromossômicas são alterações na estrutura ou no número dos cromossomos do indivíduo e podem envolver tanto cromossomos autossomos, como sexuais, resultando em mudanças na expressão gênica. Aproximadamente 0,8% dos nascidos vivos apresentam algum tipo de anomalia e metade desses exibem um fenótipo anormal (SHARKEY *et al.,* 2005). A alteração fenotípica mais comum observada em crianças e adolescentes é o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (VASCONCELOS, 2004).

A síndrome de deleção do braço curto do cromossomo 18 (OMIM #146390), ou síndrome de Grouchy, foi descrita pela primeira vez em 1963 (THIEFFRY *et al.,* 1963; de GROUCHY *et al.,* 1964). É uma alteração cromossômica rara, com incidência de 1:50.000 nascidos vivos. Os pacientes apresentam um amplo espectro clínico, variando de acordo com o tamanho do segmento perdido e número de genes envolvidos. Sendo assim, os sinais clínicos bem descritos associados a melhor definição de ponto de quebra, têm sido preconizados por diversos autores, no intuito de relacionar qual gene está modulando para cada fenótipo (CODY *et al.,* 2009a; CODY *et al.,* 2009b; SEBOLD *et al.,* 2015).

A síndrome 18p- acomete principalmente indivíduos do sexo feminino. As características desta síndrome variam de anomalias congênitas menores a holoprosencefalia,

sendo a baixa estatura e alterações craniofaciais as mais comuns (PACHAJOA, 2016; SUN *et al.,* 2018).

Aproximadamente 85% dos casos originam de deleções *de novo* e o restante estão relacionados a rearranjos estruturais desequilibrados (SPINNER *&* EMANUEL, 2002). Apesar dos avanços tecnológicos, a citogenética convencional continua sendo uma ferramenta fundamental no diagnóstico dos pacientes, tanto para identificar qual tipo de alteração, como para aconselhamento genético.

Aqui, relatamos o caso de uma menina com deleção *de novo* do 18p, utilizando o cariótipo convencional como teste diagnóstico.

2 | MATERIAS E MÉTODOS

Este estudo atendeu aos princípios da Declaração de Helsinque. O formulário de consentimento para a publicação (Anexo 1) e as imagens que o acompanham foram assinados pelos responsáveis pela paciente.

O diagnóstico da paciente foi realizado por meio de análise cromossômica em células do sangue periférico, seguindo a metodologia de bandeamento G padrão (DRETS, M.E., & SHAW, M.W., 1971). O procedimento também foi realizado nos genitores da probanda.

Realizamos uma revisão da literatura e incluímos pacientes com a síndrome 18p- relatados anteriormente em bancos de dados públicos disponíveis (PubMed, Medline).

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

A probanda é uma menina, com idade atual de 2 anos e 2 meses de vida. Nasceu de parto cesáreo, com 38 semanas, pesando 2670g e 42cm, com perímetro cefálico 34cm e apgar 9/9. Segunda filha de casal não consanguíneo, a mãe com 39 anos de idade, alega gestação normal sem nenhuma intercorrência, negando uso de teratógenos durante a gestação, informando apenas o uso de Aerolin ®, devido às crises de asma. O casal possui uma filha saudável, com idade atual de 6 anos, além de um menino de 14 anos, hígido, proveniente da primeira união paterna. Ambos negam casos de malformações ou deficiência intelectual na família, conforme heredograma abaixo (Figura 1).

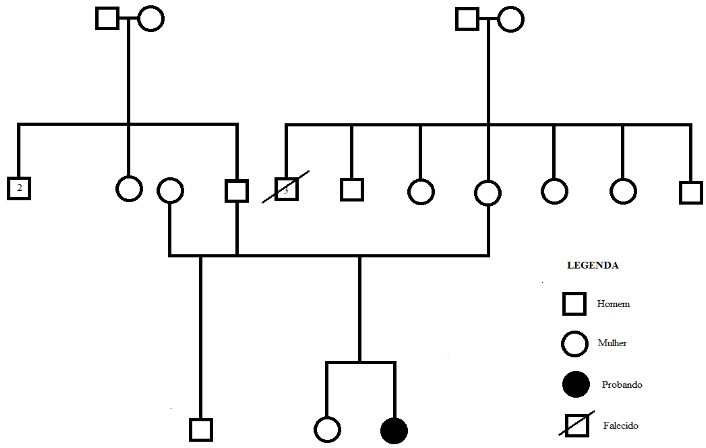


Figura 1 - Representação esquemática do heredograma da probanda contemplando três gerações.

No teste do pezinho, não foram observadas alterações, ao contrário do teste da orelhinha, cujo resultado identificou baixa amplitude auditiva e foi solicitada repetição do mesmo. A audiometria comportamental não apresentou alterações.

Os marcos motores de desenvolvimento da probanda não foram registrados no período esperado, seu desenvolvimento não correspondia à sua idade cronológica.

Aos quatro meses, começou a sustentar a cabeça e, com cinco meses de vida, fez sua primeira internação hospitalar, devido à bronquiolite, durante 23 dias. Nesse período, foi observado pela pediatra membros curtos, sendo indicada avaliação ortopédica que não identificou anormalidades.

Entre 9 e 10 meses, começou a sentar sozinha, comportamento normalmente observado em torno do 5º mês, onde a criança começa a sentar com apoio e, no 7º mês já é capaz de sustentar o tronco permanecendo ereta sem apoiar. Neste período, a paciente foi encaminha ao geneticista por suspeita de síndrome Down.

Com 10 meses de vida, pesava 6260kg, com estatura de 60 cm e perímetro cefálico de 42cm. Foram evidenciadas dismorfias craniofaciais caracterizadas por fontanela anterior, amplas fendas oculares de inclinação inferior, filtrum longo e liso, raiz nasal plana, ponte nasal afilada, alas nasais largas, orelhas de baixa implantação com fistula auris à direita. Encurtamento rizo-mesomélico e dobras extras de peles nos membros superiores e inferiores.

Foram realizados ultrassons do abdômen e do quadril, que não revelaram alterações, e o de transfontanela, onde foi possível observar uma leve dilatação dos ventrículos laterais. Também não foram encontradas alterações no ecocardiograma, bem como no raio-x da coluna.

Aos 15 meses de vida, a sua idade óssea era equivalente a 3 meses, momento que começou a dar os primeiros passos com apoio, andando somente a partir dos 2 anos de idade. Atualmente, evolui com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e déficit importante no crescimento pôndero-estatural (<<P2) (Foto 1). Não apresenta desenvolvimento típico da linguagem e da fala, discorrendo poucas palavras, sem conseguir juntá-las em frases.

Foto 1 - Características fenotípicas da probanda atualmente com 2 anos 6 meses de vida

O resultado da análise cromossômica da paciente foi 46,XX,del(18)(p11.2), conforme a figura 2. O cariótipo materno obteve resultado normal (46,XX) e o paterno apresentou somente heteromorfismos citados em padronização de nomenclatura internacional como variantes normais (46,XY,14cenh+,15pstk+)(ISCN,2016).

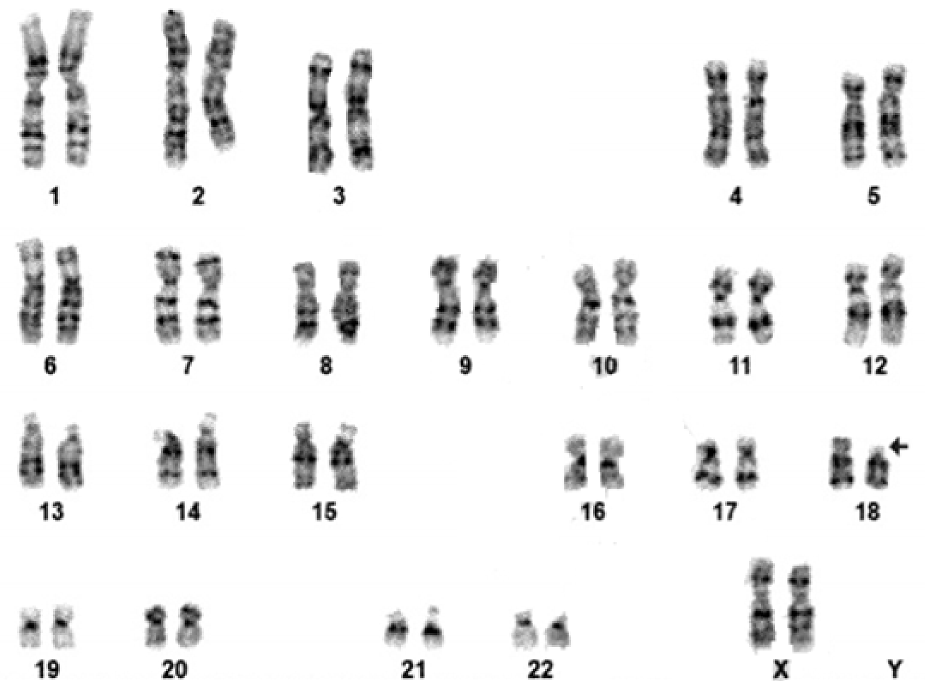


Figura 2 – Cariótipo de banda G da paciente apresentando a deleção no cromossomo 18 indicada pela seta preta.

Fonte: Banco de dados do Departamento de citogenética do Instituto Hermes Pardini

A deleção do braço curto do cromossomo 18, encontrada na nossa paciente, acomete genes que desempenham funções importantes, como os genes *LAMA1, DLGAP1, MTCL1, FAM210A, USP14* e *SMCHD1*, conforme a figura 3.

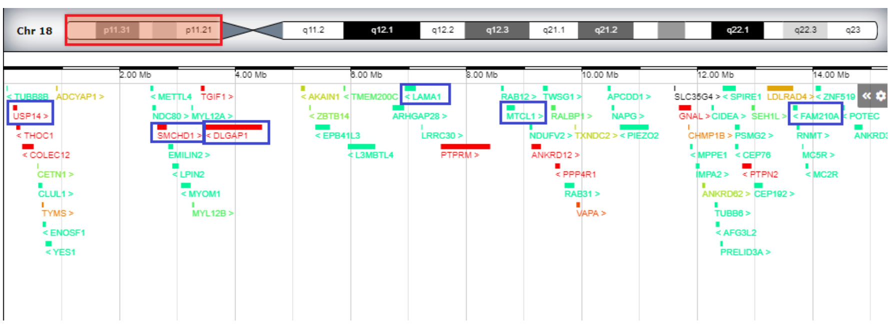


Figura 3 – Genes importantes destacados em azul, localizados no braço curto do cromossomo 18. Idiograma do cromossomo 18, com retângulo vermelho evidenciando a região deletada na paciente. Fonte:Adaptado de Decipher (FIRTH, H.V *et al.* 2009)

Os genes *LAMA1*, *DLGAP1* e *MTCL1* são conhecidos por participarem do desenvolvimento do cerebelo, funções ligadas ao sistema nervoso central e na diferenciação do segmento inicial axônico das células neuronais (ALDINGER *et al*., 2014, KIM *et al.,* 1997). Desta forma, pressupõe-se que a haploinsuficiência desses genes estaria envolvida com as alterações neurológicas observadas na paciente relatada. No banco de dados DECIPHER, tais perdas gênicas são classificadas como patogênicas.

Segundo Wester *et al.,* (2006), a região entre 18p11.1 e 18p11.21 parece ser crítica na determinação da deficiência intelectual, visto que alguns pacientes com deleções mais distais apresentam desenvolvimento intelectual normal.

As disfunções neuromusculares observadas podem estar relacionadas à perda do gene *MYOM1* presente na região. Este gene codifica a proteína (Myomesin 1) que é um componente estrutural importante de miofibrilas do tecido muscular (GUILHERME *et al*., 2014). Um estudo recente de Nasir *et al*., (2006), pesquisou uma mãe e filho com distonia muscular e verificou que ambos apresentavam síndrome 18p-, envolvendo este gene.

O gene *FAM210A* tem um papel crucial na regulação da estrutura, função óssea e muscular, sugerindo assim que esse gene esteja contribuindo com baixa estatura e disrupção motora observada (TANAKA K.I. *et al.,* 2018).

Também vale destacar o gene *SMCHD1*, essencial na inativação do cromossomo X, mesmo sem relatos de associação de haploinsuficiência do mesmo com alterações no crescimento, outros pacientes com mutação neste gene já foram descritos com fenótipo de baixa estatura, anomalias faciais e distrofia muscular (KINJO *et al.,* 2020, XU, L.J. *et al.,* 2017 & QI HONG M.D. *et al.,* 2019).

O gene *USP14* também encontra-se deletado e sua mutação vem sendo associada a retardo do crescimento. Estudos em camundongos mostraram que a mutação do gene *USP14* em homozigose resultou na redução de expressão de proteínas, levando os animais a apresentarem déficit de crescimento e alterações graves de comportamento (ANDERSON *et al.,* 2005). Em um estudo realizado por Brenk *et al.,* (2007), quatro pacientes com deleções 18p apresentaram deficiência de crescimento pós natal e convulsões, sugerindo que alterações na região localizada entre 18p11.3 e 18p11.2 estão relacionadas a este fenótipo. Desta forma, a expressão monoalélica de *SMCHD1* e *USP14* pode estar corroborando para o quadro clínico da paciente aqui apresentada.

No quadro 1, estão descritos os principais fenótipos encontrados em pacientes relatados anteriormente em bancos de dados que apresentam a síndrome de deleção do cromossomo 18p, além da paciente relatada no presente artigo.

Autor	Principais fenótipos associados			
	Baixa estatura	ADNPM	Dismorfismos	Holoprosencefalia
Maranda, B. *et al.*, 2006	X	X	x	
Babaji, P. *et al.*, 2014	X		x	x
Pachajoa, H. 2016	X	X	x	
Xu, L.J. *et al.*, 2017	X	X	x	
Crosiers D. *et al.*, 2018	X	X	x	
Mello, C.B *et al.*, 2018	X	X	x	
Qi Hong M.D. et al., 2019	X		x	
Probanda	X	X	x	

Quadro 1 – Principais fenótipos associados à síndrome do cromossomo 18p.

A grande variabilidade fenotípica, relacionada à síndrome de deleção do 18p dificulta seu diagnóstico, não sendo possível a suspeita da mesma somente através de sinais clínicos. A síndrome de deleção de 18p tem como principais achados clínicos atraso de desenvolvimento/dismorfias e baixa estatura, podendo evocar a síndrome de Down, como ocorrido na paciente apresentada, bem como a síndrome de Turner.

Sendo assim, o exame citogenético por bandamento G é de suma importância e indispensável. Além disso, é essencial no aconselhamento genético, pois modifica o cálculo de risco de repetição na prole quando há rearranjo equilibrado em um dos progenitores.

4 I CONCLUSÃO

O presente artigo apresentou o caso de uma menina encaminhada ao geneticista por suspeita de síndrome de Down, apresentando atraso de desenvolvimento e baixa estatura. Após o teste citogenético, foi constatada a deleção *de novo* do braço curto do cromossomo 18, caracterizando a Síndrome de Grouchy.

Considerada uma síndrome rara, a publicação de novos casos auxilia no conhecimento de suas características clínicas, ajudando no diagnóstico precoce. Apesar de não existir tratamentos específicos, intervenções reabilitadoras precoces são recomendadas para estimular o desenvolvimento das habilidades psicomotoras, proporcionando melhor qualidade de vida.

Apoio e Financiamento Instituto Hermes Pardini.

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

ALDINGER, K. A. *et al.* **Mutations in LAMA1 cause cerebellar dysplasia and cysts with and without retinal dystrophy.** The American Journal of Human Genetics , v. 95, n. 2, p. 227-234, 2014.

ANDERSON, C. *et al*. **Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice.** Journal of Neurochemistry, v. 95, n. 3, p. 724-731, 2005.

BABAJI, P. *et al*. **Deletion of short arm of chromosome 18, Del(18p) syndrome**. Journal of the Indian Society of Pedodontics and preventive Dentistry, v. 32, p. 68-70, 2014.

BRENK, C. H. *et al.* **Towards mapping phenotypical traits in 18p- syndrome by array-based comparative genomic hybridisation and fluorescent in situ hybridisation.** European Journal of Medical Genetics, v. 15, p. 35-44, 2007.

CODY, J. D. *et al.* **A gene dosage map of Chromosome 18: a map with clinical utility.** Genetics in Medicine, v. 11, p. 778–782, 2009.

CODY, J. D. *et al*. **Narrowing critical regions and determining penetrance for selected 18q- phenotypes.** American Journal of Medical Genetics Part A, v. 149A, n. 7, p. 1421-1430, 2009.

CROSIERS, D. *et al*. **Spectrum of Movement Disorders in 18p Deletion Syndrome.** Movement Disorders Clinical Practice, v. 6, n. 1, p. 70-73, 2019.

DRETS, M. E., & SHAW, M. W. "**Specific banding patterns of human chromosomes.**" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America v. 68, 1971.

FIRTH, H.V. *et al.* **DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources**. American.Journal Human Genetics, v. 84, p.524-533, 2009.

de GROUCHY, J. *et al.* **Partial deletion of the long arms of chromosome 18.** Pathologie Biologie, v. 12, p. 579-582, 1964.

GUILHERME, R. S. *et al*. **Duplication 9p and their implication to phenotype.** BMC Medical Genetics, v. 15, p. 142-148, 2014.

ISCN: **International system for human cytogenomic nomenclature.** 2016. In: McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, editors. Basel: S. Karger; 2016.

KIM, E. *et al.* **GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules.** Journal of Cell Biology, v. 136, n. 3, p. 669-678, 1997.

KINJO, K. *et al*. **Rare variant of the epigenetic regulator SMCHD1 in a patient with pituitary hormone deficiency**. Scientific reports, v. 10, n. 10985, p. 1-8, 2020.

MARANDA, B. *et al*. **Familial deletion 18p syndrome: case report.** BMC Medical Genetics, v. 7, n. 60, p. 1-6, 2006.

MELLO, C. B. *et al*. **Intellectual, adaptive and behavioural characteristics in four patients with 18p deletion syndrome.** Journal of Intellectual Disability Research, v. 63, n. 3, p. 225-232, 2018.

NASIR, J. *et al*. **Unbalanced whole arm translocation resulting in loss of 18p in dystonia**. Movement Disorders Journal, v. 21, p. 859-863, 2006.

PACHAJOA, H. **Síndrome por deleción 18p diagnosticado por array de hibridación genómica comparada. Presentación de un casocon fenotipo leve.** Archivos Argentinos de Pediatria, v. 114, n. 6, p. 448-449, 2016.

QI, H. *et al.* **Prenatal diagnosis of de novo monosomy 18p deletion syndrome by chromosome microarray analysis**. Medicine, v. 98, n. 14, p. 1-5, 2019.

SEBOLD, C. *et al*. **Whole arm deletions of 18p: medical and developmental effects.** American Journal of Medical Genetics Part A, v. 167A, n. 2, p. 313-323, 2015.

SHARKEY, F. H. *et al*. **Chromosome analysis: what and when to request.** Archives of Disease in Childhood, v. 90, n. 12, p. 1264–1269, 2005.

SPINNER, N. B, & Emanuel, B.S. **Deletions and other structural abnormalities of the autosomes**. In: Rimoin DL, Emery AEH, editor. Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. London, v. 1, p. 1210–1211, 2002.

SUN, H. *et al*. **Genotype-Phenotype Analysis, Neuropsychological Assessment, and Growth Hormone Response in a Patient with 18p Deletion Syndrome.** Cytogenetic and Genome Research, v. 154, n. 2, p.71-78, 2018.

TANAKA, K. I. *et al*. **FAM210A is a novel determinant of bone and muscle structure and strength.** Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, v. 115, n. 16, p. 3759-3768, 2018.

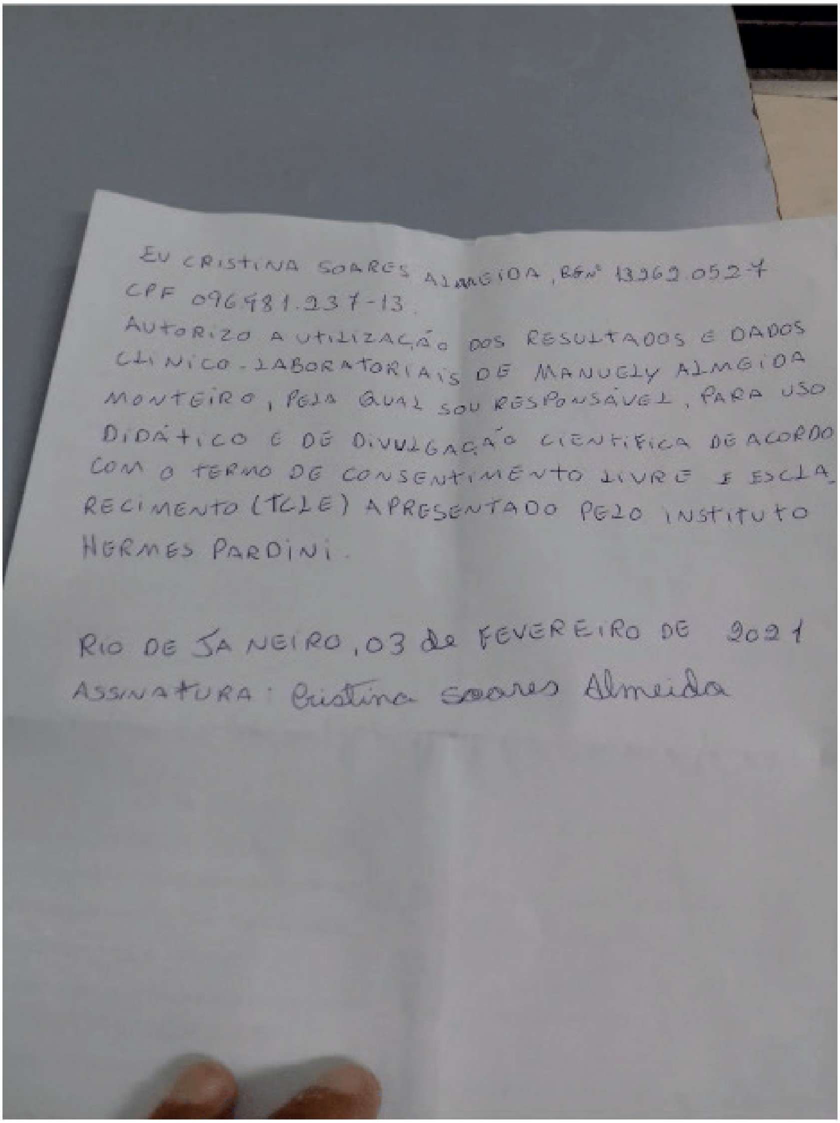
THIEFFRY, S. *et al*. **Deletion of the short arms of chromosome 17-18: complex deformities with oligophrenia.** Archives de Pediatrie, v. 20, p. 740-745, 1963.

VASCONCELOS, M. M**. Mental retardation**. Jornal de Pediatria, v. 80, n. 2, p. 71-82, 2004.

WESTER, U. *et al.* **Clinical and molecular characterization of individuals with 18p deletion: a genotype-phenotype correlation.** American Journal of Medical Genetics Part A, v. 140, n. 11, p. 1164-1171, 2006.

XU, L. J. *et al.* **A case of 18p deletion syndrome after blepharoplasty.** International Medical Case Reports Journal, v. 10, p. 15-18, 2017.

ANEXO 1



EU CRISTINA SOARES ALMEIDA, RG Nº 13262.052-7
CPF 096981.237-13.
AUTORIZO A UTILIZAÇÃO DOS RESULTADOS E DADOS CLINICO-LABORATORIAIS DE MANUELY ALMEIDA MONTEIRO, PELA QUAL SOU RESPONSÁVEL, PARA USO DIDÁTICO E DE DIVULGAÇÃO CIENTIFICA DE ACORDO COM O TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO (TCLE) APRESENTADO PELO INSTITUTO HERMES PARDINI.

RIO DE JANEIRO, 03 de FEVEREIRO DE 2021
ASSINATURA: Cristina Soares Almeida

SOBRE O ORGANIZADOR

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitatsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico. Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro. Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto "Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde" (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Ambiente 5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 31, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 47, 49, 52, 64, 65, 93, 111, 112

B

Biometria 5, 22, 23, 24, 28, 32, 102

C

Cancer 15, 19, 20, 21, 80, 81, 114, 115, 122, 123, 124, 127, 128, 131, 132

Caracterização 6, 14, 22, 23, 25, 28, 31, 32, 58, 99, 103

Célula 5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 73, 74, 76, 77, 80

Conservação 5, 11, 24, 28, 55, 56, 57, 58, 103

Crambe abyssinica Hochst 5, 90, 91, 99

Cromossomo Philadelphia 5, 15

Cromossomos 5, 9, 13, 14, 16, 17, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 135, 136, 138, 144

D

Danio Rerio 5, 114, 115, 128

Divergência Genética 5, 23, 30, 31, 32, 101, 112

DRESS 5, 6, 33, 34, 35, 36

E

Ensino 5, 6, 7, 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43

Exantema 5, 33, 34

Extração DNA 45

Eye Disorders 5, 114

G

Germinação 5, 5, 7, 90, 91, 93, 98, 99, 101, 102, 103, 106, 107, 108, 110, 111, 112, 113

H

Herdabilidade 5, 101, 106, 110, 111

Hipersensibilidade 6, 33, 34, 35

História da Medicina 15

Hortaliça 101, 102

Hylocereus 5, 56, 57, 112

I

Integridade 5, 44, 45, 51, 52, 60, 65, 66, 69, 76, 77

In Vivo Animal model 5, 114

K

Kidney Disease 5, 114, 125, 132

L

Laboratórios 5, 7, 37, 38, 39, 40, 41, 42

M

Manual de Laboratório 37

Maracujazeiro 8, 82, 83, 84

Medicamentos 14, 33, 34, 35, 72

Método de extração 5, 7, 60, 61

Micropropagação 5, 82

Mitose 5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 136

Morfologia dos frutos 23

N

Neurological Disorders 5, 114, 129

P

Produção 5, 23, 26, 57, 59, 79, 83, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 99, 107, 112

Pureza 5, 7, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 60, 62, 66

R

Radiologia 7, 37, 38, 40, 41, 42

Reações a drogas 5, 33, 34

RNA 5, 7, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 77, 78, 119

S

Saúde 5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 33, 37, 42, 138, 154

Sequência didática 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12

Stylosanthes 5, 7, 44, 45, 46, 53, 60, 61, 62, 63, 65, 70, 71

Stylosanthes sp. 5, 45

T

TCL 5, 8, 82, 83, 84, 85, 86, 88

Tecidos vegetais 5, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53

Telomerase 5, 72, 73, 76, 77, 78, 79, 80, 81

Telômeros 5, 7, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79

Tirosina Quinase 15

V

Variabilidade 5, 22, 23, 26, 27, 55, 56, 57, 58, 62, 75, 103, 110, 150

A GENÉTICA E A CONSTRUÇÃO DE NOVOS PARADIGMAS NAS CIÊNCIAS DA VIDA

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora

Ano 2021

A GENÉTICA E A CONSTRUÇÃO DE NOVOS PARADIGMAS NAS CIÊNCIAS DA VIDA

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora

Ano 2021